

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta lesnická a dřevařská

Katedra ochrany lesa a entomologie



**Analýza vybraných faktorů ovlivňujících výskyt *Chalara fraxinea*
v prostředí**

Disertační práce

Autor: Ing. Ludmila Havrdová

Školitel: doc. Ing. Petr Šrůtka, Ph.D.

Odborný školitel: Mgr. Karel Černý, Ph.D.

2015

"Prohlašuji, že jsem disertační práci na téma „Analýza vybraných faktorů ovlivňujících výskyt *Chalara fraxinea* v prostředí“ vypracovala samostatně s použitím uvedené literatury a na základě konzultací a doporučení školitele. Souhlasím se zveřejněním disertační práce dle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách v platném znění, a to bez ohledu na výsledek její obhajoby.

V Průhonicích dne

Podpis autora

Poděkování

Děkuji svým školitelům prof. Ing. Markovi Turčánimu, Ph.D. a doc. Ing. Petrovi Šrůtkovi, Ph.D. za odborné vedení disertační práce. Odbornému školiteli Mgr. Karlovi Černému, Ph.D. za odborné vedení terénních prací, konzultace k metodice a za pomoc při sestavení disertační práce, doc. Ing. Danovi Zahradníkovi, Ph.D. za rady a pomoc při statistickém zpracování rozsáhlých dat, RNDr. Dušanovi Romportlovi Ph.D. za rady a získání digitálních dat terénu a děkuji všem spoluautorům odborných publikací. Svým nejbližším pak děkuji za velkorysost, trpělivost a podporu.

Dále bych ráda poděkovala za pomoc, rady a zázemí Ing. Alexandru Hrozkovi (SCHKO Lužické hory), za cenné rady a konzultace Ing. Jiřímu Kučerovi (EMS Brno) a Dr. Janu Pivcovi (ČZU FAPPZ KAB), za pomoc při instalaci dataloggerů Ing. Petrovi Zábranskému (ČZU FAPPZ KAB) a lesním správám LČR Česká Lípa a Rumburk za vstřícnost.

Disertační práce byla podpořena projekty Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy č. ČZU IGAFLD201113, ČZU IGAFLD20124354 a ČZU CIGA20124309 a projektem Ministerstva zemědělství České republiky č. NAZV QI92A207 a NAZV QJ1220218.

Abstrakt

Analýza vybraných faktorů ovlivňujících výskyt *Chalara fraxinea* v prostředí Analysis of selected factors affecting the occurrence of *Chalara fraxinea* in the environment.

Rozsáhlý výzkum dopadu nekrózy jasanu v různých typech porostu venkovské krajiny (solitérní výsadba, roztroušená výsadba, břehové porosty, suťové lesy a jasanové olšiny) byl proveden na území CHKO Lužické hory v letech 2011 – 2013. Podíl nekrózy jasanu a 27 proměnných prostředí bylo sledováno na 80 výzkumných plochách a 1045 hodnocených stromech.

Vytvořený GLM model vysvětluje cca 27 % variability onemocnění. Jednotlivé modely pro každý typ porostu se od sebe významně lišily a vysvětlily 28 – 46% variability onemocnění. Mezi proměnné pozitivně ovlivňující dopad onemocnění patří plocha koruny hostitele, plocha jasanu a podíl jasanu na ploše, pokryvnost stromového patra, zástin koruny, severní orientace, keře a travní porost, vertikální heterogenita a směrodatná odchylka TPI. Výška stromu, vzdálenost a míra poškození nejbližšího okolního napadeného hostitele, vzdálenost od vody, sklon a jeho směrodatná odchylka ovlivňují dopad onemocnění negativně. Souběžné poškození *Armillaria* sp. a *Hylesinus fraxini* pozitivně ovlivňuje rozvoj onemocnění naproti tomu výskyt *Nectria* sp. a *Aceria fraxinivorus* ho průkazně omezuje, pravděpodobně pomocí sekundárních metabolitů.

Byla identifikována vysoce průkazná regrese podílu nekrózy jasanu na ploše na počet dní s vlhkostí vzduchu vyšší než 95 % mezi 06 – 11 hod v době největšího šíření askospor. Protože je přízemní vzdušná vlhkost velmi závislá na lokálních faktorech prostředí, byl vyvinut s pomocí sledovaných faktorů GLM model vysvětlující variabilitu vlhkosti vzduchu. Model vysvětlil 77 % variability vlhkosti vzduchu, přičemž mezi faktory, které ji průkazně ovlivnily, patřily TPI 5 a směrodatná odchylka TPI, orientace, sklon, nadmořská výška, vzdálenost od vody, stromové a keřové patro, výška stromu a některé další. Krajinné útvary byly identifikovány jako faktory (pravděpodobně také skrze vzdušnou vlhkost), které rovněž ovlivňují dopad onemocnění – například stanoviště na vrcholech a svazích jsou méně poškozovány než stanoviště v údolích.

Vegetační typy se značně lišily v rozsahu onemocnění. Obecně platí, že solitérní výsadba a suťové lesy byly průkazně méně poškozovány, než jasanové olšiny a břehové

porosty. Porosty s malým objemem korun byly méně poškozeny než porosty s velkým objemem korun. Porosty uvnitř plného lesního zápoje byly méně poškozeny než stromy se srovnatelným objemem korun na otevřených stanovištích a porosty na stanovišti s vyšší vzdušnou vlhkostí (břehové porosty a jasanové olšiny) byly více poškozovány než porosty s menší dostupností vody.

Výsledky jasně podporují možnost vytvoření metodiky managementu choroby v lesních porostech a v krajině a její aplikovatelnost.

Klíčová slova: nekróza jasanu, invaze, krajina, faktory prostředí, vlhkost vzduchu

Abstract

Analysis of selected factors affecting the occurrence of *Chalara fraxinea* in the environment.

Analýza vybraných faktorů ovlivňujících výskyt *Chalara fraxinea* v prostředí

Extensive investigation of ash dieback impact on different rural vegetation types (solitaires, scattered plantations, riparian stands, scree- and ash-alder alluvial forests) was performed in the Lusatian Mts. (the Czech Republic) between 2011 and 2013. The rate of ash dieback and 27 environmental variables were investigated in 80 research plots with a total of 1045 evaluated trees.

The developed model (GLM) explained ca 27% of the disease variability. Particular models for each vegetation type importantly differed from each other and explained 28–46% of the disease variability. The variables that positively affected the disease impact included the host crown area, ash area and rate of ash in the stands, tree layer area, canopy closure, north aspect, shrub and herbaceous layer canopy, vertical heterogeneity and standard deviation of TPI. Tree height, the distance and damage of the nearest host as well as the water source distance, slope and its standard deviation affected it negatively. The coincidental attack of the trees by *Armillaria* sp. and *Hylesinus fraxini* positively affected the disease progress, whereas the presence of *Nectria* sp. and *Aceria fraxinivorus* conclusively decreased progress, most likely via the induction of secondary metabolites.

The highly conclusive regression of ash dieback on the number of days with an air humidity of >95% between 6–11 a.m. in the main period of ascospore spread was identified. Because the air humidity near the ground was highly affected by local factors, a GLM model explaining the variability of air humidity with that of investigated factors was developed. This model explained 77% of the variability attributed to air humidity, local factors (TPI and SD of TPI, aspect, slope, altitude, distance from open water, tree and shrub layers canopy, tree stand height, etc.) greatly affected the disease impact related to air humidity. The landscape form was identified as a factor (most likely via air humidity) that affects the impact of the disease – for example, the stands on mountain tops and slopes were less affected than the stands in valleys.

The vegetation types highly differed in the disease extent. In general, the solitaires and scree forests were significantly less damaged than mixed ash-alder forests

and riparian stands. The smaller stands were less affected than the more extended, the stands enclosed in canopy of other forests were less damaged than comparable vegetation in open landscapes and stands with higher humidity (riparian stands and mixed ash-alder forests) were more damaged than those without water.

The outcome clearly supports the possibility of development and usefulness of appropriate forest and landscape management of the disease.

Key words: ash dieback, invasion, landscape, environmental factors, air humidity

Obsah:

1. Úvod.....	9
2. Cíle.....	11
3.1. Charakteristika jasanu (<i>Fraxinus</i> spp.).....	12
3.1.1. Jasan ztepilý (<i>Fraxinus excelsior</i> L.).....	12
3.1.2. Jasan úzkolistý (<i>Fraxinus angustifolia</i> Vahl.).....	13
3.2. Charakteristika <i>Hymenoscyphus fraxineus</i> (T. Kowalski) Baral, Queloz, Hosoya.....	13
3.2.1. <i>Chalara fraxinea</i> – příčina nekrózy jasanu.....	14
3.2.2. <i>Chalara fraxinea</i> – rozšíření a výskyt patogenu.....	15
3.2.3. Životní cyklus <i>H. fraxineus</i> a symptomy napadení.....	17
3.3. Význam <i>Hymenoscyphus fraxineus</i>	19
3.4. Možná opatření.....	20
4. Metodika.....	22
4.1. Modelové území, výběr výzkumných ploch.....	22
4.2. Sběr dat.....	23
4.3. Popis proměnných.....	24
4.3.1. Typy výsadeb a popis poškození.....	24
4.3.2. Popis hostitele – dendrometrické proměnné.....	26
4.3.3. Popis hostitele – biotické a abiotické proměnné.....	28
4.3.4. Popis prostředí – obecné proměnné.....	28
4.3.5. Popis prostředí – měření vlhkosti vzduchu a teploty.....	29
4.3.6. Popis prostředí – DMR, GIS.....	29
4.4. Statistické zpracování dat.....	30
5. Výsledky.....	33
5.1. Význam nekrózy jasanu v různých typech porostu.....	34
5.2. Vlhkost vzduchu ovlivňuje intenzitu napadení jasanu.....	44
5.3. Nekróza jasanu v břehových porostech.....	51
5.4. Odlišnost české a evropské populace <i>H. fraxineus</i>	56
5.5. Faktory ovlivňující výskyt a význam patogenu.....	65
6. Diskuse.....	92
7. Závěr.....	97
8. Literatura.....	98

1. Úvod

Jasan ztepilý (*Fraxinus excelsior*) byl dlouhou dobu z hlediska zdravotního stavu a výskytu možných patogenů v ČR shledáván jako relativně bezproblémová dřevina. Mezi vážnější patogeny a škůdce jasanu bylo možno zařadit např. fytoftory (*Phytophthora* spp.), verticilia (*Verticillium* spp.), padlí jasanové (*Phyllactinia fraxini*), rážovku (*Nectria galligena*), pseudomonas (*Pseudomonas savastanoi* pv. *fraxini*), rezavce štětinatého (*Inonotus hispidus*), lýkohuba jasanového (*Hylesinus fraxini*) a zrnitého (*Hylesinus crenatus*) či dutilku jasanovou (*Prociophilus bumeliae*) a některé další organismy (Gregorová a kol. 2006). Po té, co bylo od poloviny 90. let v severovýchodní Evropě pozorováno intenzivní chřadnutí jasanů (Kowalski a Holdenrieder 2008) se tato situace zásadně změnila.

Jako příčina nebezpečného hromadného odumírání jasanů (tzv. nekróza jasanu v Evropě známá jako „ash dieback“), jehož původce – *Chalara fraxinea* Kowalski 2006 byl poprvé identifikován v r. 2001 (Kowalski 2001, 2006). Pozdější studie potvrdily náležitost tohoto hyfomycetu ke kryptickému druhu *Hymenoscyphus fraxineus* (T. Kowalski) Baral, Queloz, Hosoya (Baral a kol. 2014). Patogen se rychle rozšířil do dalších částí Evropy (EPPO 2007, 2008a, b, 2010) včetně ČR, kde byl poprvé potvrzen r. 2007 a dnes se vykytuje víceméně na celém území státu (Jankovský a Holdenrieder 2009; Havrdová a Černý 2012). Nebezpečnost patogenu a jeho rychlé šíření znepokojuje lesnické a další odborníky ve velké části Evropy. Obecně je pohled na další vývoj epidemie velmi skeptický a někteří autoři připouštějí i možnost kolapsu celých populací jasanu (např. McKinney a kol. 2011). Jasan není jako dřevina příliš ceněn a obvykle není určen k hospodářskému pěstování, používá se jako meliorační dřevina a větší roli hraje spíše v porostech ochranných a v břehových porostech. Nekróza jasanu způsobuje problémy v celé řadě různých typů porostů a výsadeb. Nejvýraznější problémy se vyskytují ve výsadbách s vyšším zastoupením a významem jasanu, a to na vlhčích stanovištích v jasanovo-olšových luzích a v tvrdých luzích nížinných řek, obecně také v břehových porostech. Dopad choroby je už teď lokálně velmi výrazný i ve výsadbách ve volné krajině, kde je jasan často významnou složkou prvků ÚSES, a to nejen v břehových porostech, ale i stromořadích, remízích a další roztroušené výsadbě (Havrdová a Černý 2012).

Vzhledem ke značné ekologické valenci jasanu a jeho výskytu v nejrůznějších vegetačních stupních, společenstvech a na různých stanovištích lze ale předpokládat, že dopad choroby se může lišit v závislosti na typu výsadeb, porostů a společenstev a může být také závislý na různých faktorech prostředí. Z hlediska dlouhodobého hospodaření v krajině je důležité disponovat informacemi o invazibilitě různých typů porostů, jejich poškození a o významu nejdůležitějších faktorů prostředí v epidemiologii choroby (Havrdová a Černý 2012).

Z hlediska diverzity dřevin v krajině je invaze *H. fraxineus* zcela zásadním problémem. Po epidemii grafiózy jilmů (*Ophiostoma ulmi*, *O. novo-ulmi*), kdy poklesla četnost populace našich jilmů na cca 5 – 10 % a poté, co se na území ČR rozšířila plíseň olšová (*Phytophthora alni*) a začala decimovat porosty olše lepkavé a olše šedé (Černý a kol. 2007; Černý a Strnadová 2010), význam jasanu ztepilého výrazně narostl. Situace se ovšem zásadně změnila v posledních cca 10 letech, kdy se i jasan stal středem pozornosti fytopatologů a jeho předpokládané použití musí být zásadně revidováno. Znalost faktorů ovlivňujících výskyt a význam *H. fraxineus* může pomoci při managementu pěstování jasanu a tím ke zvýšení biodiverzity v krajině.

2. Cíle

Hlavním cílem disertační práce je determinovat faktory prostředí, které mohou ovlivňovat distribuci a význam nekrózy jasanu způsobené *Hymenoscyphus fraxineus* (*Chalara fraxinea*).

Mezi jednotlivé dílčí cíle patří:

Určení rozsahu poškození a významu patogenu v jednotlivých typech vegetace, určení rozdílů v poškození jednotlivých vegetačních prvků.

Určení vlivu charakteristik porostů na rozsah poškození.

Určení vlivu klimatických faktorů na rozsah poškození.

Určení vlivu geomorfologických a krajinně-ekologických faktorů na rozsah poškození.

Ověření vlivu vybraných geomorfologických, vegetačních a dalších prvků na vzdušnou vlhkost pravděpodobně přímo ovlivňující epidemiologii choroby.

3. Literární řešerše

3.1. Charakteristika jasanu (*Fraxinus* spp.)

Fraxinus spp. patří do čeledi olivovníkovitých (*Oleaceae*). V ČR má tento rod dva zástupce: *F. excelsior* a *F. angustifolia*. Jasan se řadí mezi světlomilné dřeviny, které v mládí vyžadují (zastínění Wardle 1961) a lépe se pak vyvíjí (Pagan 1996). Jasan má vysoké stanovištní nároky, požaduje živinami bohaté, humózní, čerstvě vlhké, hlubší půdy (Vyskot a kol. 1978; Pagan 1996; Dobrowolska a kol. 2008; Úradníček a kol. 2009). Přednost dává půdám zásaditým, nejlépe obohaceným dusíkem (Wardle 1961). Přirozený výskyt jasanu bývá indikátorem nejlepších půd (Gregorová a kol. 2006; Úradníček a kol. 2009). Jasan bývá často těžce poškozován pozdními mrazy (zejména na nových letorostech), v zimních měsících po oslunění trpí korní spálou (Gregorová a kol. 2006). Nesnese mrazové kotliny, na suchých stanovištích trpí letními vedry a nesnáší dlouhotrvající záplavy a stagnující vodu (Slavík 1997; Gregorová a kol. 2006; Dobrowolska a kol. 2008; Bajcar a Longauer 2012).

3.1.1. Jasan ztepilý (*Fraxinus excelsior* L.)

Jasan ztepilý patří mezi dlouhověké dřeviny, dožívá se až 200–250 let, s přímým kmenem a podlouhle vejcovitou, poměrně řídkou korunou, dosahující výšky až 40–43 m (Wardle 1961; Slavík 1997; Úradníček a kol. 2009). Ve stoprocentním zápoji jasan vytváří štíhlý, přímý kmen, v řídkém zápoji běžně korunu příliš rozkládá a ve vrcholu vidličnatí (Vyskot a kol. 1978). Kořenový systém jasanu je rozsáhlý a bohatě rozvětvený, proto je jasan na svém stanovišti dobře ukotven. Jeho kořeny často vzájemně srůstají, proto může tvořit v řadě nebo ve skupině velmi účinný ochranný val (Válek 1977).

Jasan ztepilý je vhodná dřevina do vysokokmenného lesa, ale používaný je i v lese výmladkovém (Vyskot a kol. 1978), nepatří však mezi významné hospodářské dřeviny. Přirozené zmlazení jasanu je časté v suťových a lužních lesích, běžný je jako pionýrská dřevina. V sadovnictví bývá často vysazován jako solitér či alejový strom (Slavík 1997), významný je především jako meliorační dřevina a dřevina ochranných lesů či lesních pásů (Gregorová a kol. 2006).

Jasan ztepilý se běžně vyskytuje ve velké části Evropy, je naší hojnou domácí dřevinou rozšířenou roztroušeně od nížin do horských poloh celého území v lužních lesích, pobřežních křovinách, suťových a roklinových lesích (Wardle 1961; Slavík 1997). Na území ČR jsou zastoupené tři ekotypy jasanu ztepilého (Gregorová a kol 2006; Úradníček a kol. 2009), které se především různí ve svých nárocích na vláhu. Lužní jasan je v zaplavovaných luzích podél větších řek nejčastěji provázen dubem letním a jilmu. Horský jasan je zastoupen v oblasti buku tam, kde jsou příznivé vlhkostní a půdní poměry, tj. zejména podél potoků s olšemi a na suťových prameništích ve stráních, často spolu s klenem a jilmem horským a vystupuje až do výše 1000 m n. m. Vápencový jasan provází na bazických horninách často dub zimní, ale objevuje se v porostech s bukem, břekem i v lesostepních společenstvech s šipákem (Úradníček a kol. 2009). Existence těchto ekotypů bývá ovšem někdy zpochybňována (Dobrowolska a kol. 2008)

3.1.2. Jasan úzkolistý (*Fraxinus angustifolia* Vahl.)

Jasan úzkolistý je strom menšího vzrůstu, dosahující výšky 20–35m, s řídkou široce vejcovitou korunou (Slavík 1997). V rámci ČR je jasan úzkolistý díky jeho okrajovému přirozenému výskytu méně významný než jasan ztepilý.

Jasan úzkolistý je dřevina jihoevropského rozšíření, zastoupená ve všech zemích kolem Středomoří. Z Panonské nížiny vybíhá areál do nejteplejších částí Slovenska a jižní Moravy – roste jen v lužních lesích Dolnomoravského a Dyjskosvrateckého úvalu, nejseverněji zasahuje k Olomouci. Jeho rozšíření je velmi mezernaté a sestává v pásu lužních lesů – podél vodních toků v nížinách. Ekologické nároky jasanu úzkolistého jsou podobné nárokům lužního ekotypu jasanu ztepilého (Úradníček a kol. 2009).

3.2. Charakteristika *Hymenoscyphus fraxineus* (T. Kowalski) Baral, Queloz, Hosoya

Hymenoscyphus fraxineus je mikroskopická houba patřící mezi askomycety (*Helotiales*, *Leotiomycetes*, *Ascomycota*), jejíž anamorfní (nepohlavní) stádium *Chalara fraxinea* na jasaněch parazituje. Jedná se o vláknitý organismus, jehož subhyalinní až olivově hnědé hyfy měří v průměru přibližně 1,2–3,0 μm (Kowalski 2006). Na hyfách se v kultuře

vytvářejí krátké hnědé sporangiofory nebo konidiogenní buňky (tzv. fialidy, $16\text{--}24 \times 4\text{--}5 \mu\text{m}$) produkující konidie (nepohlavní spory) o rozměrech $3,2\text{--}4,0 \times 2,0\text{--}2,5 \mu\text{m}$ ve slizovité kapce, občas v řetízcích (Kowalski 2006; Gross a kol. 2014). Patogen přezimuje v živých pletivech hostitele (výhony, větve) ve formě mycelia a v opadlém materiálu (listy, výjimečně výhony) ve formě pseudosklerocií. Koncem jara a v létě se na pseudosklerociích v opadu z předešlého roku vyvíjejí bělavé stopkaté miskovité plodničky (apotecia) pohlavního stádia *Hymenoscyphus fraxineus* měřící v průměru cca $1,5\text{--}3 \text{ mm}$ (Kowalski a Holdenrieder 2009b), vzácně až 8 mm (Gross a kol. 2014). V plodničkách se vytvářejí protáhlá kyjovitá vřecka ($80\text{--}107 \times 8\text{--}10 \mu\text{m}$), obsahující 8 hyalinních tenkostěnných jednobuněčných askospor ($13\text{--}21 \times 3,5\text{--}5,0 \mu\text{m}$) obsahujících obvykle jednu či dvě olejové krůpěje (Gross a kol. 2014).

3.2.1. *Chalara fraxinea* – příčina nekrózy jasanu

Tento mikroskopický patogen způsobující onemocnění jasanů byl poprvé identifikován v r. 2001 (Kowalski 2001) a v r. 2006 popsán pod jménem *Chalara fraxinea* Kowalski (Kowalski 2006). Jako jeho pohlavní stádium (teleomorfa) byl později označen *Hymenoscyphus albidus* (voskovička bělavá), saprofytický diskomycet běžně se vyskytující v opadu na řapících jasanových listů či na odumřelých výhonech jasanu (Kowalski a Holdenrieder 2009b). Následující molekulární studie analyzující větší množství materiálu sebraného z opadu a izolovaného z nekróz ovšem ukázala, že *Chalara fraxinea* náleží k novému kryptickému druhu – *Hymenoscyphus pseudoalbidus* Queloz, Grünig, Berndt, T. Kowalski, T. N. Sieber & Holdenrieder (Queloz a kol. 2011), který je morfologicky téměř totožný s výše zmíněným *Hymenoscyphus albidus* a výrazněji se liší jen některými molekulárními charakteristikami (mj. sekvencí ITS regionů rDNA), virulencí vůči jasanu (Queloz a kol. 2011). Studie herbářových položek potvrdila, že *H. pseudoalbidus* se v Evropě (Švýcarsko) vyskytuje už nejméně 30 let (Queloz a kol. 2011). Později se ukázalo, že před cca 80 lety byl v Japonsku popsán další kryptický druh *Lambertella albida* (Zhao a kol. 2012). Po srovnání evropských a japonských vzorků bylo potvrzeno, že parazitický druh *H. pseudoalbidus* se morfologicky i molekulárně shoduje se saprofytickým druhem *Lambertella albida* vyskytujícím se na jasanovém opadu *Fraxinus mandshurica* v Japonsku (Gross a kol. 2014). Tím byly potvrzeny původní domněnky, že patogen byl do Evropy zavlečen z Asie (Queloz a kol. 2011). Upřesněním nomenklatury se zabývala studie Barala, jež

pro druh zavedla nové jméno *Hymenoscyphus fraxineus* (T. Kowalski) Baral, Queloz, Hosoya, comb. nov. (Baral a kol. 2014), které se v současné době používá.

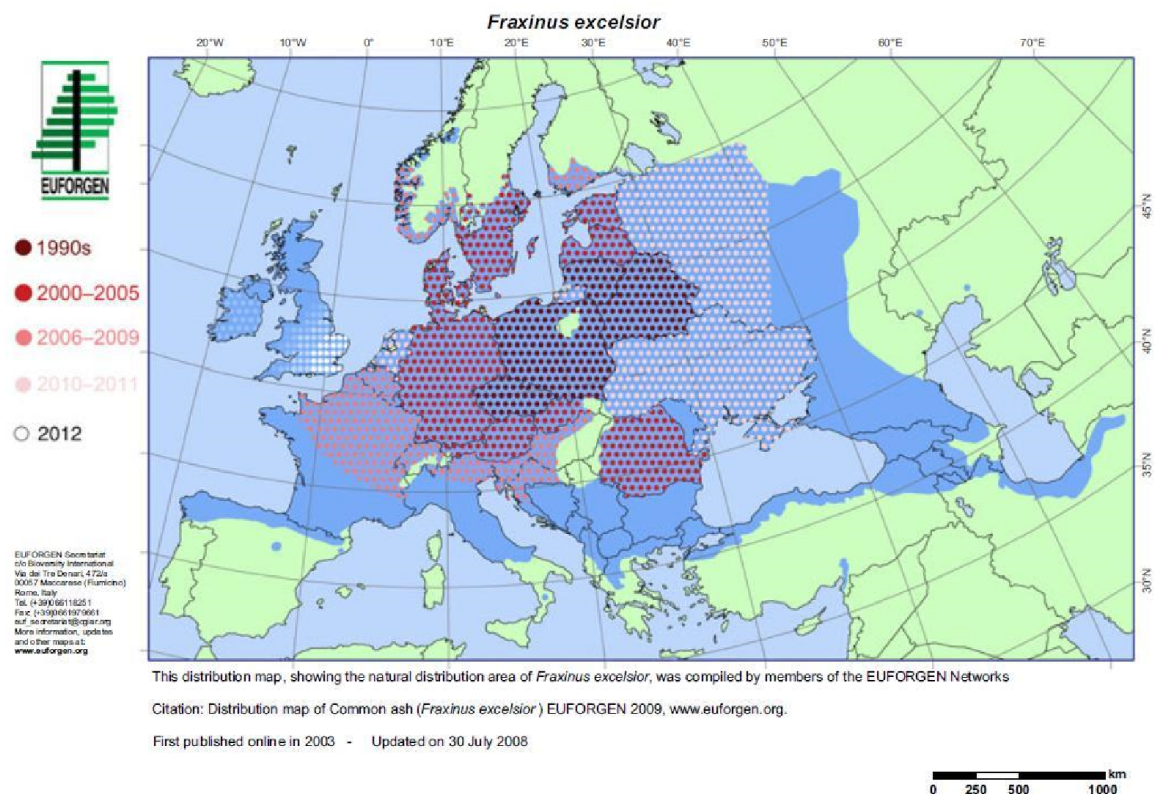
3.2.2. *Chalara fraxinea* – rozšíření a výskyt patogenu

Patogen byl do Evropy pravděpodobně zavlečen importovanými semenáčky, nebo semeny jasanu (Zhao a kol. 2012). Např. během sovětské éry v letech 1960–1980 byl do pobaltských zemí v několika zásilkách importován jasan mandžuský (*F. manshurica*) z ruského Dálného východu (Drenkhan a kol. 2014). V současné době je již patogen rozšířen po velké části Evropy, vlna epidemie se pohybuje od severovýchodu, především na jihozápad Evropy, na sever, jih a východ je postup poněkud pomalejší. V současné době se organismus vyskytuje téměř na celém kontinentu (např. EPPO 2007, 2010; Thomsen a kol. 2007; Halmschlager a Kirisits 2008; Kirisits a kol. 2009, 2010; Kowalski a Holdenrieder 2009a; Ogris a kol. 2009; Szabó 2009; Talgø a kol. 2009; Barić a Diminić 2010; Schumacher a kol. 2010; Chandelier a kol. 2011; Husson a kol. 2011; Rytönen a kol. 2011; Timmermann a kol. 2011; Hendry a kol. 2012; Davydenko a kol. 2013), s výjimkou okrajových států, jako je např. Španělsko (Obr. 1). Lze ovšem předpokládat, že i v těchto státech bude patogen brzy nalezen. Rychlý postup epidemie souvisí s tím, že se patogen šíří vzduchem ve formě spor pohlavního stádia – askospor (Kowalski a Holdenrieder 2009b; Timmermann a kol. 2011; Gross a kol. 2014). Z celoevropského hlediska je situace nejhorší pravděpodobně v Polsku a Pobaltí, kde se patogen vyskytuje ve větší intenzitě nejdelší dobu a kde dochází k poškození velkých ploch výsadeb jasanu (Zachara a kol. 2007) a kde je současná fáze vývoje choroby označována za post-epidemickou (Lygis a kol. 2015).

Ze studia herbářových dokladů (Národní muzeum) vyplývá, že se patogen v ČR vyskytuje nejméně od roku 2002 (projekt MZe NAZV QJ1220218), nicméně velmi pravděpodobně se zde vyskytoval už od konce 90. let, kdy byly pozorovány první chřadnoucí porosty jasanů. Na chřadnutí jasanů bylo poprvé v ČR upozorněno v roce 2008 (Jankovský a Palovčíková 2008; Nárovec a kol. 2008a, b). První úspěšná izolace *Chalara fraxinea* a tedy potvrzení patogenu v ČR byla provedena v r. 2007 (Arboretum Křtiny) a poté byl patogen izolován na několika dalších lokalitách na jižní Moravě a Vysočině – Ochoz u Brna, Hradčany u Brna (školka) a Lomnice u Tišnova (Jankovský a Holdenrieder 2009). Další rozšíření patogenu bylo izolačně potvrzeno v severních, východních, středních a západních Čechách a severní Moravě (Havrdová nepubl.).

Rozšíření tzv. nekrózy jasanu je ovšem výrazně širší – symptomy jsou popisovány již z celého území ČR a patogen se velmi pravděpodobně víceméně roztroušeně vyskytuje na většině území státu (Havrdová et Černý 2011). Infekce postupuje ze sv. na jz., a proto můžeme na jz. Čech pozorovat jasanové porosty v lepším zdravotním stavu, i když i zde význam patogenu rychle narůstá. V současné době se patogen vyskytuje víceméně hojně na celém území státu.

Výskyt nekrózy jasanu byl zjištěn ve všech věkových kategoriích jasanu a na všech typech stanovišť, kde se objevují. V České republice byl výskyt onemocnění zjištěn u solitérních jedinců, roztroušených výsadeb v krajině, ve stromořadích, větrolamech, okrasné zeleni ve městech, v břehových porostech, v ochranných porostech na svazích a v nejrůznějších typech lesních porostů včetně jasanových olšin a lužních porostů (projekt MZe NAZV QJ1220218) bez ohledu na nadmořskou výšku (Koukol a Havrdová 2014). Vůči tomuto patogenu jsou oba naše původní druhy jasanu *Fraxinus excelsior* i *F. angustifolia* vysoce citlivé, přičemž *F. angustifolia* se jeví o něco méně náchylný (Havrdová et al., v řízení). Výskyt patogenu byl v Evropě potvrzen i z některých nepůvodních druhů jasanu – *F. nigra*, *F. pennsylvanica*, *F. americana*, *F. mandschurica* (Drenkhan a Hanso 2010), mírně náchylný je i jihoevropský druh *F. ornus* (Kirisits a kol. 2009).



Obr. 1: Rozšíření *F. excelsior* (modrá zóna) a rozšíření nektrózy jasanu (červená– bílá barva) (převzato z Mc Kinney a kol. 2014 a EUFORGEN, www.euforgen.org).

3.2.3. Životní cyklus *H. fraxineus* a symptomy napadení

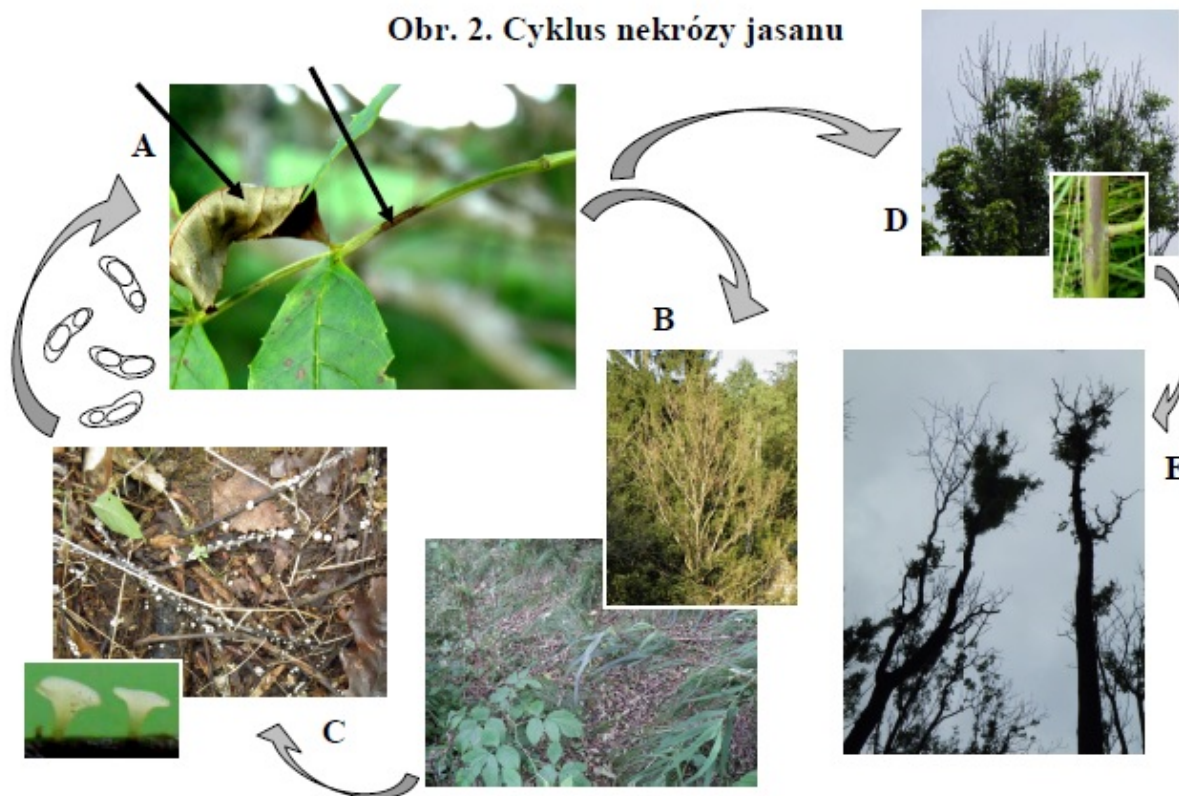
Celý životní cyklus *Hymenoscyphus fraxineus* probíhá pouze na listech jasanu (Gross a kol. 2014). Patogen se ve formě askospor pohlavního stádia (*H. fraxineus*) šíří větrem a primárně napadá listy jasanu a jejich řapíky. Po dopadu na čepele a řapíky listů jasanů spory klíčí, hyfa proniká do buněk listu, mycelium postupně kolonizuje list a dochází k nekrotizaci jeho pletiv (Obr. 2A). V důsledku napadení následuje opad napadených listů a někdy až značné odlistění dřevin (Obr. 2B; Bakys a kol. 2009a), což je obranná reakce hostitele (jasanu) na napadení patogenem. Na opadlém materiálu patogen přezimuje ve formě pseudosklerocií a další vegetační sezónu se zejména na odumřelých řapících vytvářejí bělavé miskovité stopkaté plodničky (apotecia) pohlavního stádia *Hymenoscyphus fraxineus* (Obr. 2C; např. Kirisits a Czech 2009). Tyto plodničky se objevují od června do září (října) s největším výskytem v létě (červenec – srpen) a produkují velké množství pohlavních spor (askospor), které jsou unášeny větrem, kolonizují další listy (Timmermann a kol. 2011) a cyklus se opakuje. Spíše ve výjimečných případech dochází k tvorbě apotecií i na napadených výhonech hostitele (Timmermann a kol. 2011).

Nová studie Kirisits (2015) ukazuje, že apotecia se na plodničkách mohou opakovaně vyvíjet minimálně 5 sezón po opadu, tzn., že množství zdroje inokula se v okolí hostitele neustále zvyšuje s množstvím kolonizovaného materiálu.

Před předčasným opadem listů však může docházet k prorůstání mycelia pletivem řapíku dál přes listové stopy (cévní svazky vstupující ze stonků do listů) do výhonů a větví, kde patogen způsobuje rozsáhlé černavé až hnědavé nekrózy, které se rychle prodlužují transpiračním a především asimilačním směrem, přičemž části výhonů a větví nad poškozením mohou usychat (Obr. 2D; např. Kowalski a Holderieder 2008, Bakys a kol. 2009b). Kromě toho může patogen pravděpodobně pronikat do výhonů i pupeny, lenticelami (Husson a kol. 2012), poraněními či v místech posátí hmyzem. *H. fraxineus*, resp. jeho anamorfní stádium *Ch. fraxinea*, byla pomocí molekulární analýzy také nalezena v semenech jasanu, k jejichž infekci mohlo dojít přímo askosporami, nebo prorůstajícím myceliem z napadených výhonů (Cleary a kol. 2013). Patogen proniká i do dřevní hmoty, kde vytváří tmavé nekrotické zbarvení (Schumacher a kol. 2010), délka těchto nekrotických nekrotických pletiv na kůře výhonu (Bengston a kol. 2014).

U vzrostlých jedinců se onemocnění ve fázi nekrotizovaných výhonů projevuje postupným řídnutím koruny a odumíráním výhonů (zpravidla přírůstku posledního roku). Během jedné sezóny může být napadeno velké množství výhonů (Obr. 2D) a koruna napadené dřeviny může výrazně prosychat od obvodu. Dále dochází k odumírání drobných a později i kosterních větví a k rozsáhlému poškození stromu. Hostitel na rozvoj patogenu reaguje tvorbou proventivních výhonů (vlků), které vytváří pod odumřelými částmi větví a vzniká typické shlukovité olistění. Mycelium patogenu v pletivech hostitele (výhonech, větvích) může přežít zimu (patogen byl z napadených výhonů úspěšně izolován v zimním období – Havrdová nepubl.), dále se šířit a poškození dřeviny postupně narůstá. Dochází k masivnímu odumírání drobných a později i kosterních větví a k rozsáhlému poškození (Obr. 2F), které může dosahovat až 80 – 90 % objemu koruny a strom nakonec odumírá.

Hostitel pravděpodobně může v některých případech oddělit napadenou část pletiv kalusem (hojivé pletivo) a infekci zastavit. Nelze vyloučit, že se patogen v pletivech hostitele může šířit ve formě konidií i cévními svazky, ale tento způsob nebyl dosud prokázán.



Obr. 2: Cyklus nekrózy jasanu (Havrdová a Černý 2013).

3.3. Význam *Hymenoscyphus fraxineus*

Patogenem jsou napadány stromy všech věkových kategorií na různých typech stanovišť – od přirozených lesů po komerční lesní výsadby a výsadby okrasné (Kowalski a Łukomska 2005; Kirisits a Halmschlager 2008; Kirisits a Freinschlag 2012). Sazenice a mladé výsadby jasanů jsou nekrozou jasanu poškozovány rychleji (Skovgaard a kol. 2010) a ve větším rozsahu (mladé stromky mohou v důsledku napadení odumřít i během jedné vegetační sezóny) než výsadby plně vzrostlé (Havrdová a Černý 2012).

Z hlediska lesního hospodářství představuje významnou hrozbu v kategoriích lužní a údolní (1L, 2L, 3L, 5L a 1U, 3U a 5U) a částečně i v nižších výškových stupních řady vlhké (1V a 2V). Významným problémem bude obnova břehových porostů s dominantním zastoupením jasanu a olše v případě souběžného napadení olší druhem *Phytophthora alni*. Dále lze předpokládat problémy v suťových lesích a v ochranných porostech na svazích. Vzhledem k rychlému letálnímu průběhu choroby u mladých

stromů dochází ke značným ztrátám v lesním školkařství (mnohde přestal být jasan zcela pěstován). Lze také očekávat značné problémy v mladých výsadbách jasanů. Použití jasanu jako MZD bude muset být rovněž revidováno. Patogen působí významné škody i ve výsadbách ve volné krajině, jejichž je jasan významnou složkou a to nejen v břehových porostech, ale i stromořadích, remízích a další roztroušené výsadbě. Patogen způsobuje rovněž značné škody v okrasných výsadbách ve městech a obcích. Obecně je pohled na další vývoj situace velmi skeptický a někteří autoři připouštějí i možnost kolapsu celých populací jasanu (McKinney a kol. 2011).

V současné době jsou vyčísleny pouze ekonomické ztráty v lesním školkařství v ČR, které se pohybují v řádu milionů Kč ročně (projekt MZe NAZV.QJ1220218), škody v lesních porostech a dalších výsadbách nebyly dosud vyčísleny, lze ale předpokládat, že budou dosahovat mnohem vyšších hodnot. V současné době již dochází k úplným, nebo částečným rekonstrukcím napadených lesních porostů jasanu.

3.4. Možná opatření

Ochranná opatření nejsou dosud známá a mnozí fytopatologové o jejich účinnosti pochybují (např. Jankovský a kol.; Queloz a kol. 2011). Jisté je, že pokud budou nějaká opatření doporučena, budou se lišit pro různé typy pěstování jasanu. Např. v lesním školkařství bude zapotřebí používat fungicidní přípravky a dodržovat standardní opatření prováděná v případě výskytu jakékoli vážné choroby. Opatření v napadených vzrostlých výsadbách asi budou v následujících letech stěží zahrnovat více než postupnou náhradu odumírajících jasanů jinými stanovištně odpovídajícími dřevinami, podobně jako v případě napadení porostů olší druhem *Phytophthora alni* (Černý 2011), nebo jilmů druhem *Ophiostoma novo-ulmi*.

V současné době převládají názory, že jediné možné opatření pro zachování druhu *F. excelsior* a *F. angustifolia* je výběr méně citlivých (odolnějších) genotypů jasanu vůči nekróze jasanu, jejich následné křížení a šlechtění (např. McKinney a kol. 2011).

Výzkum faktorů prostředí potenciálně ovlivňujících průběh a rozsah poškození nekrozou jasanu dosud neprobíhal. Nicméně lze předpokládat, že průběh a význam nekrózy jasanu by měl být ovlivňován různými faktory prostředí (například vlhkostí vzduchu), podobně jako u dalších chorob šířících se vzduchem např. *Apiognomonina*

spp., *Glomerella cingulata*, *Venturia* spp. (Sinclair a Lyon 2005). Výzkumem faktorů prostředí potenciálně ovlivňujících rozvoj choroby a jejím dopadem se zabývá tato disertační práce.

4. Metodika

4.1. Modelové území, výběr výzkumných ploch

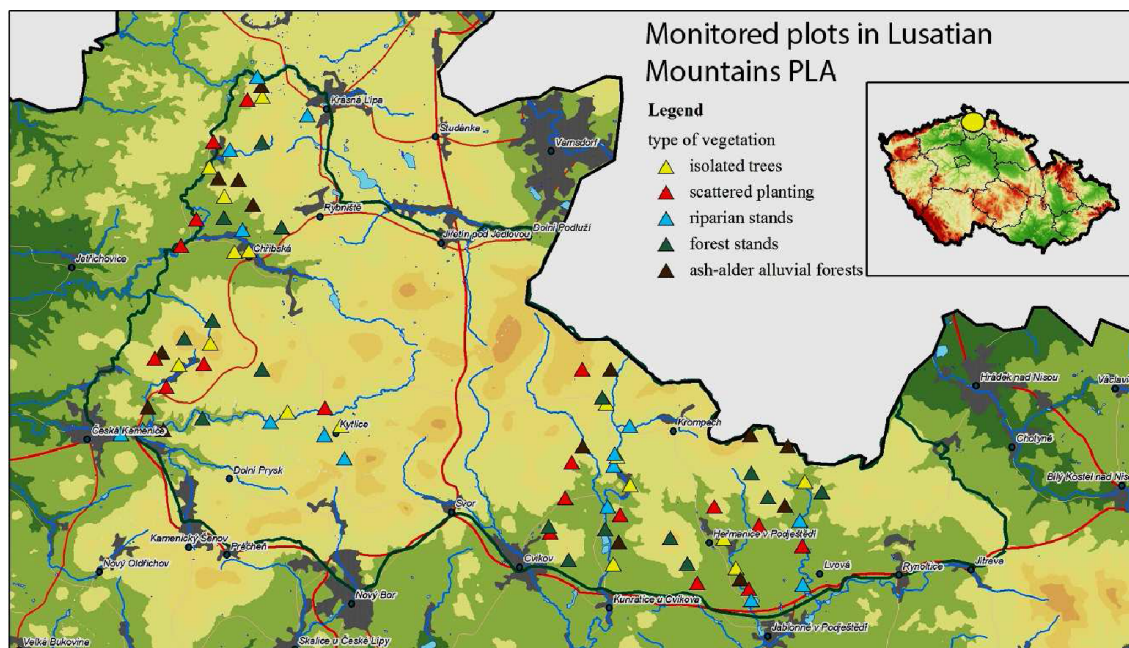
Pro výzkum bylo vybráno modelové území CHKO Lužické hory, geomorfologicky i vegetačně velmi heterogenní. Území CHKO Lužické hory je lokalizováno mezi 50° 46' – 50° 55' s.š. a 14° 25' – 14° 52' v.d. a na poměrně malé rozloze (264 km²) se značným výškovým gradientem (312 – 793 m n. m.). Na území jsou zastoupeny téměř všechny významné typy porostů s jasanem. Patogen do oblasti invadoval přibližně před 9 lety a porosty jsou tak již delší dobu vystaveny významnému infekčnímu tlaku. Patogen je dnes rozšířen po celém území a jeho populace je zde relativně ustálená.

Výzkum poškození jednotlivých typů porostů a jeho vazba na vybrané faktory prostředí byl proveden v letech 2011 – 2013. V různých částech území CHKO byly vybrány čtyři užší oblasti o ploše cca 20 km² respektující geomorfologickou a vegetační variabilitu území CHKO a zohledňující výskyt jasanu. Každá oblast pak byla rozdělena na 20 čtverců o straně 1 × 1 km. V každém čtverci byla vybrána pouze jedna výzkumná plocha – kruh o poloměru 50 m. Výběr ploch byl prováděn tak, aby byla vzdálenost mezi sousedními plochami co největší – minimální vzdálenost byla 500 m a to pouze v několika výjimečných případech. Standardní vzdálenost mezi sousedními plochami je minimálně cca 700 – 800 m, aby nedocházelo ke vzájemnému ovlivnění ploch. Plochy byly voleny jako homogenní jak z hlediska geomorfologie tak i porostu, aby je bylo možno jasně zařadit do příslušné kategorie vegetace. Při výběru ploch bylo respektováno pravidlo, aby v každé oblasti byly rovnoměrně zastoupeny všechny definované kategorie porostů a to pokud možno rovnoměrně na výškovém gradientu. Pokud ve čtverci nebyl nalezen žádný jasan, nebo porost neodpovídal příslušným parametrům (např. nedostatečná pokryvnost, významný antropogenní zásah do porostu atp.) byl vybrán jiný, přilehlý čtverec, dokud nebyl naplněn předepsaný počet vybraných ploch. Zároveň bylo pokud možno respektováno pravidlo, aby ve dvou sousedních čtvercích nebyl hodnocen porost stejné kategorie. Celkem bylo vybráno 80 výzkumných ploch, přičemž střed každé z nich byl zaznamenán pomocí GPS (Garmin GPSMAP 62s) v souřadnicovém systému WGS-84.

4.2. Sběr dat

První výzkum proběhl během 10. 7. – 31. 8. 2011 na 80 plochách, při kterém byl sledován rozsah procentuálního poškození korun jasanů na jednotlivých výzkumných plochách v pěti kategoriích porostů. U jednotlivých stromů a ploch byly sledovány proměnné popisující výskyt a charakter hostitele a charakter prostředí. V roce 2012 bylo ze stávajících 80 modelových ploch sledovaných v roce 2011 vybráno 50 ploch (Obr. 3), na kterých byla během 10. 6. 2012 – 15. 11. 2013 měřena navíc teplota a vlhkost vzduchu. Plochy byly vybírány tak, aby co možná nejvíce pokryly zjištěnou variabilitu prostředí – nadmořskou výšku, expozici a sklon terénu a geomorfologii. Při výběru ploch byla rovněž respektována variabilita v úrovni poškození porostů. V roce 2013 v období 1. 7. – 31. 8. 2013 bylo opakováno měření z roku 2011. V následujícím roce 2014 byla na základě souřadnic jednotlivých ploch získána data z DMR (Digitální Model Reliéfu) a GIS (Geografický Informační Systém), s jejichž pomocí byly plochy popsány z hlediska krajinné ekologie.

Terénní sběr dat byl vždy ukončen ještě před výraznějším předčasným opadem listů způsobeným *H. fraxineus*, který by mohl ovlivnit výsledky (do konce srpna). Na každé ploše bylo sledováno celkem 35 proměnných: podíl nekrózy jasanu (závislá proměnná), 20 nezávislých proměnných popisujících výskyt a charakter hostitele a 14 nezávislých proměnných popisujících charakter prostředí.



Obr. 3: Modelové plochy (80) v CHKO Lužické hory.

4.3. Popis proměnných

Některé sledované faktory prostředí a znaky na hostitelských dřevinách byly získávány a jsou zpracovány v souladu s International Co-operative Programme on Assessment and Monitoring of Air Pollution Effects on Forest (Eichhorn a kol. 2010), který sjednocuje metody sběru dat použitelných nejen pro hodnocení dopadu polutantů, ale i dalších faktorů na lesní dřeviny. Dále byly vytipovány proměnné, které by mohly být pro význam nekrózy jasanu důležité.

4.3.1. Typy výsadeb a popis poškození

Vzhledem k ekologii a historickému používání jasanu na území CHKO se tato dřevina vyskytuje v nejrůznějších typech porostů od přirozených jasanových olšin, lužních a suťových lesů, přes více či méně umělé či samovolně z náletů vzniklé remízy a stromořadí ve volné krajině až po výsadby v intravilánech. Šíře výskytu jasanu byla charakterizována pomocí pěti kategorií, z nichž každá respektuje určitý vegetační typ: (A) soliterní výskyt v otevřené krajině, (B) roztroušená výsadba (stromořadí) ve volné krajině, (C) břehové porosty, (D) lesní (suťové) porosty a (E) jasanovo-olšové luhy. Porosty byly vybírány tak, aby je bylo možné celé jednoznačně přiřadit do konkrétní kategorie a aby byla pokud možno pokryta variabilita uvnitř jednotlivých kategorií, co se týče reálného rozsahu zastoupení jasanu na daném stanovišti.

(A) Soliterní výskyt. Jedná se o soliterní jedince ve venkovské krajině, kde pokryvnost jasanu na ploše činí cca 1 – 10 %; pokryvnost stromového patra na ploše max. 10 %; stromové patro chybí min. 30 m od kraje koruny měřeného jedince.

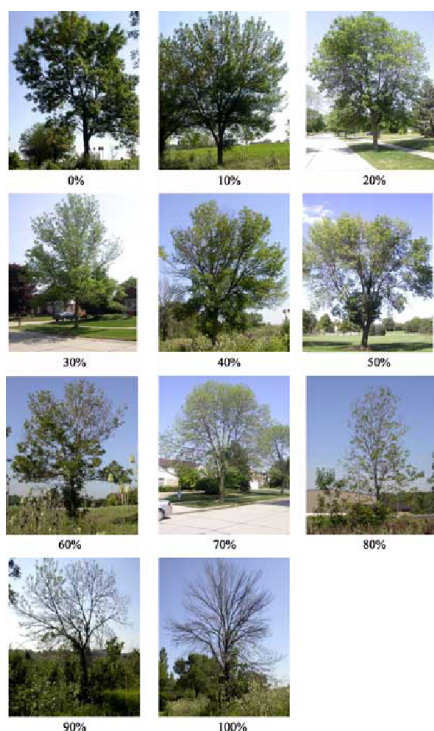
(B) Roztroušená výsadba. Jedná se o skupiny a linie ve volné venkovské krajině (remízy, linie, okraje porostů, stromořadí), kde pokryvnost jasanu na ploše činí cca 3 – 25 %; celková pokryvnost stromového patra na ploše je 10 – 30 %.

(C) Břehový porost. Jedná se o souvislé liniové břehové porosty (zhruba do 12 m celkové šířky) ve volné krajině, či v intravilánu obce, kde pokryvnost jasanu na ploše činí cca 5 – 30 %; celková pokryvnost stromového patra na ploše 15 – 40 %.

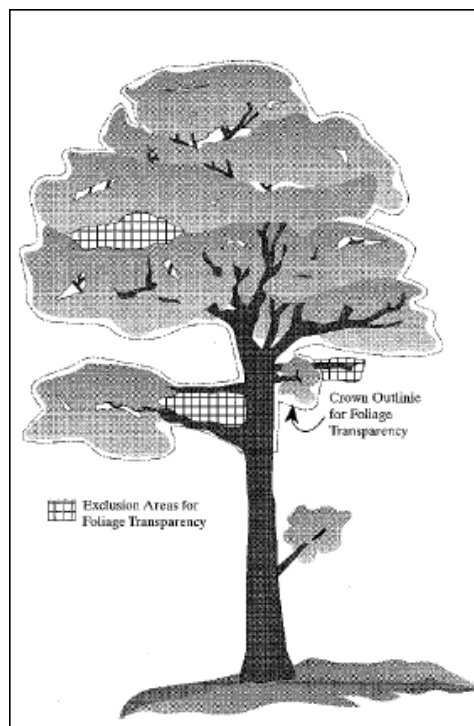
(D) Lesní porost. Jedná se o roztroušený výskyt až souvislý výskyt v lesních porostech a v ochranných porostech, kde pokryvnost jasanu na ploše činí cca 2 – 100 %; celková pokryvnost stromového patra na ploše 80 – 100 %.

(E) Jasanová olšina. Jedná se o původní či sekundární jasanovo-olšový luh či údolní jasanovou olšinu, kde pokryvnost jasanu na ploše činí cca 10 – 50 % a celková pokryvnost stromového patra na ploše 80 – 100 %.

Na sledovaných stromech a porostech byl opticky (případně za použití dalekohledu) ověřen výskyt typických symptomů nekrózy jasanu. Dále bylo zjištěno procento prosychání koruny způsobené *H. fraxineus* vyjádřené podílem suchých a odlistěných částí koruny ve srovnání se zdravým stromem (%). Pro hodnocení nekrózy koruny jasanů byla použita metoda „foliage transparency“ dle ICP Forest 2010 (Eichhorn a kol. 2010), která určuje množství světla prostupující korunou v procentech, oproti množství světla prostupujícího korunou plně olistěnou. Jako kalibrace bylo pro vizuální hodnocení prosychání koruny použito práce Smitley (2008, Obr. 4). Prosychnání >10 % bylo hodnoceno v desítkách procent a prosychnání <10 % bylo podrobněji rozděleno do hodnot 5 a 2 %. Na prosychnání jasanu měly vliv i další faktory, které byly při hodnocení rozsahu nekrózy jasanu identifikovány, ale do odhadu hodnoty tohoto znaku nebyly v souladu s ICP Forest 2010 (Eichhorn a kol. 2010) zahrnovány. Jedná se o taková místa, kde bylo postrádáno očekávané olistění z jiného důvodu než infekce *H. fraxineus* (srv. Tallent-Halsell, 1994, Obr. 5). Mezi takové faktory patřily např. následující: prosychnání koruny způsobené přirozeným způsobem (zápoj, zastínění, stáří, mechanické poškození – zlomené, odřené, suché, či zcela chybějící větve, atp.), odlistění způsobené sezónním žírem, částečná redukce olistění v souvislosti s enormní plodností některých jedinců, poškození jinými patogeny a škůdci, popř. vytloukání v mlazinách. Poškození jiného druhu než *H. fraxineus* bylo evidováno v proměnné, zdravotní stav.



Obr. 4: Řídnutí koruny jasanů a hodnocení rozsahu jejího prosychání (převzato z Smitley 2008)



Obr. 5: Náčrt míst v koruně, které budou brány na zřetel při odhadu olistění (převzato z Talent-Halsell, 1994)

Mimo procentuální prosychání způsobené *H. fraxineus*, byla také sledována orientace lokalizace nekrózy jasanu ve stupních a vertikální lokalizace nekrózy jasanu v kategoriích 1 – obvod; 2 – shora; 3 – obvod + shora; 4 – ze spodu; 5 – průběžně; 6 – obvod + ze spodu; 7 – celý proschlý strom a vertikální lokalizace zástínu koruny hostitele v kategoriích 1 – 1 strana; 2 – 2 strany; 3 – 3 strany; 4 – 4 strany; 5 – shora; 6 – (1+5); 7 – (2+5), 8 – (3+5); 9 – (4+5).

Zároveň byla měřena vzdálenost (m) a směr (stupně) k nejbližšímu napadenému hostiteli, u kterého bylo zároveň hodnoceno prosychání způsobené nekrózou jasanu (%).

4.3.2. Popis hostitele – dendrometrické proměnné

Objem koruny (m^3) je proměnná popisující množství kolonizovatelného substrátu (za zjednodušeného předpokladu homogenního zavětvení a olistění všech jedinců) a je pro vyhodnocení skutečného rozsahu poškození velmi významnou veličinou. Je zároveň zřejmé, že velmi proměnlivou realitu porostů nelze plně postihnout, proto bylo nutno akceptovat jistá zjednodušení, které ovšem při použití standardizovaných postupů mají proporcionálně stejný dopad u všech zkoumaných porostů.

Vzhledem k tomu, že se v jednotlivých porostech vyskytovaly jedinci nejruznějšího vzrůstu a tvaru včetně zmlazení, byl objem korun jednotlivých stromů na všech plochách počítán zvlášť. Protože se tvar korun jasanu různí, byl i tento faktor zahrnut při výpočtech. V dokonalém zápoji vytváří jasan přímý kmen a štíhlou, poměrně řídkou vejcovitou korunu (Wardle 1961), v řídkém zápoji jasan korunu více rozkládá a ve vrcholu často vidličnatí (Vyskot 1978) a její tvar tudíž může být kulovitý, vejcovitý až zaoblený. Zjednodušeným způsobem byl měřen objem jasanového zmlazení, jako homogenní porost) které bylo potřeba do výpočtu rovněž zahrnout.

Pro výpočet objemu koruny (V) byla měřena výška koruny a průměr koruny. Výška koruny (v ; m) byla měřena výškoměrem Nikon Forestry 550 v metrech od prvního větvení k nejvyššímu bodu koruny. Šířka (průměr) koruny byla měřena ve dvou na sebe kolmých směrech (d_1, d_2 ; m) s přesností na 0,5 m. Vzorec pro výpočet objemu korun je pro všechny tvary korun shodný, $V = \pi/6 * v * d_1 * d_2$.

V případě homogenního porostu jasanového zmlazení bylo na prostor souvisejících korun sousedních jedinců nahlíženo pro zjednodušení jako na kvádr. V tomto případě byly měřeny šířka a délka porostu a jeho průměrná výška (eventuálně průměrná výška korun). Výpočet objemu korun homogenního porostu pak proběhl podle vzorce $V = v * d_1 * d_2$. Objem korun jednotlivých jedinců (včetně zmlazení) byl pak na celé ploše sečten (m^3).

Z výše uvedených hodnot byly dopočítány proměnné, které byly použity ve statistických modelech: plocha koruny hostitele ($S = d_1 * d_2$; m^2) a součet všech ploch korun hostitele na ploše (m^2). Pomocí dálkoměru Nikon Forestry 550 byla měřena výška stromu (m) a výška nasazení koruny (m).

Na ploše byla také stanovena odhadem relativní pokryvnost stromového patra (%), ze které byla dopočítána absolutní pokryvnost ($pokryvnost_rel * 78,5$; m^2) a podíl jasanu na ploše ($suma(d_1 d_2) / pokryvnost_abs * 100$; %). Z vypočítaných hodnot byly dále získány proměnné vyjadřující množství napadené biomasy nekrózou jasanu – objem nekrózy hostitele ($objem_korun_host * prosychani / 100$; m^3), součtem objemů nekrózy u hostitelů byl získán celkový objem nekrózy jasanu na ploše (m^3) a dopočtem podíl nekrózy jasanu na ploše ($(objem_nekr_plocha / objem_korun_porostu) * 100$; %)

4.3.3. Popis hostitele – biotické a biotické proměnné

Dle předchozích pozorování byly vybrány některé biotické faktory, které by mohly ovlivňovat množství nekrózy jasanu na ploše, jejichž výskyt byl hodnocen u jednotlivých hostitelů zvláště ve formátu ano/ne. Roztoč vlnovník jasanový (*Eriophyes (Aceria) fraxinivorus*), václavka (*Armillaria* spp.), která byla rozpoznávána buď podle plodnic, nebo dle rhizomorf, které byly na základě DNA (Antonín et al. 2009) určeny jako *Armillaria cepistipes*, rážovka (*Nectria* spp.), bakterióza (*Pseudomonas savastanoi*), lýkohuby (*Hylesinus fraxini*). Dále bylo sledováno mechanické poškození jasanů, např. vytloukání, rány na bázi kmene v břehových porostech, antropogenní zásah, mrazové poškození apod. a vzdálenost hostitele od silnice.

4.3.4. Popis prostředí – obecné proměnné

V rámci terénních prací bylo sledováno nejbližší okolí hostitele. Hodnocena byla vegetace pod korunou hostitele v kategoriích, jejichž výskyt byl hodnocen ano/ne: keřové patro – zahrnující keře a zmlazení; travní porost – zahrnující louky, pastviny a neudržované příkopy; trávník – zahrnující sekaný a hrabaný trávník v zahradách. Další sledovanou proměnnou byla vzdálenost vody od hostitele (m), přítomnost vody byla hodnocena jako pozitivní nejen v případě přítomnosti vodního toku či vodní plochy, ale i prameniště a proměnná vyjadřující přítomnost *Armillaria* spp. (ano/ne) na ploše.

V rámci širšího okolí byly sledovány proměnné: – nadmořská výška ve středu plochy (m n. m.); – převažující sklon terénu zohledňující především plochu s hodnocenými jasanu (stupně); – převažující orientace terénu v osmi kategoriích: 1 S (337,6–22,5), 2 SV (22,6–67,5), 3 V (67,6–112,5), 4 JV (112,6–157,5), 5 J (157,6–202,5), 6 JZ (202,6–247,5), 7 Z (247,6–292,5), 8 SZ (292,6–337,5); – převažující orientace terénu ve čtyřech kategoriích: 1 S (316–45), 2 V (46–135), 3 J (136–225), 4 Z (226–315); – geomorfologie popisující okolí měřené plochy do vzdálenosti 250m od středu plochy v sedmi kategoriích dle Demek (1988): 1 vrchol, 2 tvary na svahu vypuklé, 3 homogenní plocha na svahu, 4 tvary na svahu vhloubené, 5 tvary údolní vypuklé; 6 tvary údolní rovné; 7 tvary údolní vhloubené; – geomorfologie přeškálovaná do 3 kategorií: 1 vrchol a vrcholové tvary, 2 svah a tvary na svahu, 3 údolí a údolní tvary; – geomorfologie dle tvaru ve třech kategoriích: 1 tvary vypuklé, 2 tvary rovné, 3 tvary vhloubené; – hydrická řada (Buček a Lacina 2007) se na sledovaných plochách

vyskytovala pouze ve třech kategoriích 3 normální, 4 zamokřená, 5a mokrá-proudící; – trofická řada (Buček a Lacina 2007) byla zastoupena 4 kategoriemi *AB* oligotrofně mezotrofní, *B* mezotrofní, *BC* mezotrofně nitrofilní, *BD* mezotrofně bazická. Trofická a hydrická řada byla dále upravena podle Löw a kol. (1995).


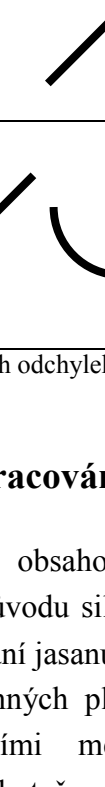
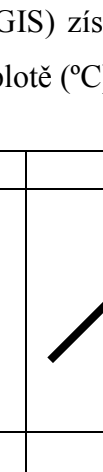
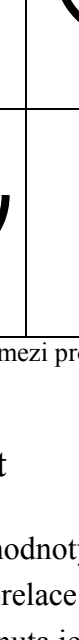
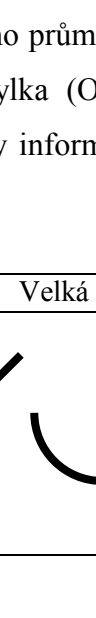
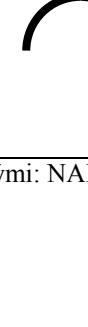
4.3.5. Popis prostředí – měření vlhkosti vzduchu a teploty

Vlhkost vzduchu byla měřena pomocí zařízení Datalogger Minikin THi (EMS Brno). Vlastnímu měření vlhkosti a teploty na vybraných plochách předcházelo měření vývoje vlhkosti a teploty v profilu koruny hostitele. Cílem bylo identifikovat pomocí 5 ti dataloggerů na jednom stromě optimální výšku umístění čidel v profilu porostu tak, aby nebyla naměřená data v korunách dřevin ovlivněna přespříliš vysokou přízemní vlhkostí a dostatečně vypovídala o situaci v prostoru šíření askospor a kolonizace listů. Měření profilu proběhlo ve výškách 1,5 m, 3 m, 4,5 m, 6 m a 7,5 m na 3 plochách (jasanová olšina, břehový porost a solitér) na konci května. Jako nejnižší vhodná výška byla vyhodnocena výška 4,5 m od paty kmene. Na vybraných 50 plochách bylo pak na začátku června 2012 instalováno 50 dataloggerů s vlastním zdrojem energie měřících v intervalu 5 min. a zaznamenávajících průměrnou vlhkost vzduchu a teplotu prostředí v intervalu 15 minut. Na každé ploše bylo instalováno vždy jedno měřící zařízení umístěné na kmeni hostitele pokud možno ve středu plochy, na severní straně kmene, chráněno radiačním krytem před vlivem solárního záření. Měření probíhalo až do listopadu 2013. Z naměřených hodnot bylo vytvořeno 21 variant různě zpracovaných dat. Pro statistický model byla vybrána proměnná, která nejlépe odpovídala době šíření askospor (Timmermann a kol. 2011) – suma počtu dní s vlhkostí ≥ 95 % mezi 6:00–11:00 hod. v období červenec – srpen v roce 2012, tedy sezónu před hodnocením jednotlivých porostů. Jako další proměnná byla vybrána průměrná denní vlhkost v období červenec – srpen v roce 2012.

4.3.6. Popis prostředí – DMR, GIS

Na základě známých souřadnic středů ploch byla pro statistický model použita data získaná z Digitálního modelu reliéfu České republiky (DMR), který je digitální reprezentací reliéfu terénu s úplnou střední chybou výšky 0,3 m v odkrytém terénu a 1 m v zalesněném terénu. Pro výpočet hodnot byla použita zonální statistika, pro průměrné hodnoty a směrodatné odchylky byl na sledovaných plochách použit rastr

o velikosti 5×5 m. Pomocí DMR byla vyhodnocena: průměrná nadmořská výška na ploše a její směrodatná odchylka, průměrný sklon terénu a jeho směrodatná odchylka, popis heterogenity krajiny pomocí TPI (Topographic Position Index). TPI pomocí zonální statistiky porovnává v DMR odlišnost měřené buňky od každé okolní buňky (Weis 2000) a klasifikuje krajinu ve dvou úrovních: pozice na svahu (např. hřeben, vrchol, dno apod.) a kategorie krajiny (strmé kaňony, mělká údolí, otevřené svahy apod.) (Jenness 2001). U TPI byla měřena jeho průměrná hodnota s rozlišením 5×5 m a 10×10 m a jejich směrodatná odchylka (Obr. 6). Dále byly pomocí Geografického informačního systému (GIS) získány informace o vzdálenosti vody od středu plochy (m) a o průměrné roční teplotě ($^{\circ}\text{C}$).

	Malá hodnota ukazatele	Velká hodnota ukazatele
NADM_V_SD		
SKLON_SD		
TPI_SD		

Obr. 6: Porovnání směrodatných odchylek (SD) mezi proměnnými: NADM_V, SKLON, TPI

4.4. Statistické zpracování dat

Původní datový soubor obsahoval hodnoty 82 proměnných pro každý z 1045 zkoumaných stromů. Z důvodu silné korelace mezi některými z těchto veličin byla do modelu pro míru prosychání jasanu zahrnuta jen jejich část.

Rozdělení výzkumných ploch do jednotlivých typů porostu do značné míry korespondovalo s ostatními měřeními charakteristikami porostu a prostředí sledovaných ploch. Tato skutečnost byla ověřena pomocí lineární diskriminační analýzy (Rencher 2002). Jako diskriminující proměnné byly použity *relativní pokryvnost*

stromového patra, podíl jasanu, vzdálenost k nejbližšímu toku, nadmořská výška, sklon terénu, variabilita sklonu, variabilita vertikální heterogenity, TPI5, variabilita TPI5 a průměrná teplota na pokusné ploše.

V rámci předběžných prací byly dále zjištěny závislosti mezi nezávisle proměnnými veličinami. V případě kvantitativních veličin byla vypočtena jejich korelační matice, pro veličiny kategoriální byly provedeny testy nezávislosti v kontingenční tabulce (Anděl 1998). Z každé skupiny silně závislých veličin byla poté na základě logické rozvahy vybrána vždy jen jedna veličina do dalšího zpracování. V případech, kdy jedna charakteristika byla popsána několika veličinami, měřenými různými způsoby (například sklon terénu byl zjišťován dvěma způsoby: pomocí GIS a přímým měřením na pokusné ploše), byla do modelu vybrána vždy jen jedna z těchto veličin, podle její úspěšnosti při odhadech parametrů modelu (1) (podrobněji v následující sekci).

Hlavním cílem předkládané práce bylo zjistit, jaký je vztah mezi mírou napadení jasanů patogenem *H. fraxineus* a veličinami charakterizujícími porostní a geografické podmínky na pokusných plochách. Pro vysvětlení míry napadení jednotlivých jasanů patogenem byl uvažován obecný lineární model

$$y_i = \sum_{j=1}^m \beta_j x_{ij} + \varepsilon_i, \quad (1)$$

kde y_i je procentuální podíl proschnutí koruny i -tého stromu, x_{ij} je hodnota j -té nezávisle proměnné veličiny u i -tého stromu, β_j jsou příslušné koeficienty lineárního modelu a ε_i jsou rezidua. Do modelu bylo zahrnuto 30 nezávisle proměnných (viz Tab. 1).

Parametry modelu (1) byly odhadnuty pomocí funkce `lm` statistického software R (R Core Team, 2015). Výběr statisticky významných proměnných lineárního modelu byl proveden metodou krokové regrese, přičemž jako optimalizační kritérium byla zvolena maximalizace hodnoty Akaikeho informačního kritéria (2)

$$A = n \left(1 + \log(2\pi s^2) \right) + 2(r + 1), \quad (2)$$

kde n je počet měření, s^2 je reziduální rozptyl a r je počet parametrů modelu.

Z předpokladů platnosti statistické analýzy modelu byly ověřeny: normalita reziduí pomocí chí-kvadrát testu dobré shody a nekorelovanost reziduí pomocí Durbin – Watsonova testu.

Tab. 1: Seznam nezávisle proměnných obecného lineárního modelu.

	Kategoriální veličiny	Kvantitativní veličiny
Charakteristika hostitele	zástin vertikální <i>Armillaria</i> spp. <i>Eriophyes fraxinivorus</i> <i>Nectria</i> spp. <i>Hylesinus fraxini</i> mechanické poškození keřové patro travní porost trávník	výška stromu nasazení koruny vzdálenost od vody vzdálenost k silnici plocha koruny
Charakteristika prostředí	<i>Armillaria</i> spp. na ploše orientace terénu hydrická řada	plocha korun jasanu pokryvnost stromového patra podíl jasanů na ploše vzdálenost k nejbližšímu hostiteli míra proschnutí nejbližšího hostitele nadmořská výška SD průměrné nadmořské výšky sklon terénu SD sklon terénu SD TPI_5 průměrná teplota počet dní s vlhkostí vzduchu > 95 % (06–11hod) průměrná denní vlhkost vzduchu

5. Výsledky

Základem výsledků předkládané disertační práce je 5 článků. Články jsou uvedeny v jednotlivých kapitolách Výsledky a zabývají se základním výzkumem patogenu. Převážně jde o dílčí výsledky výzkumu zabývajícího se vytipovanými faktory prostředí a hostitele, jedna publikace se zabývá srovnáním českých a evropských populací patogenu, jejichž rozdíl je způsoben právě faktory prostředí.

Publikovány byly tři články: 1x Jrec. (Acta Pruhoniana, 2012), 1x Jrec. Scopus (Zprávy lesnického výzkumu, 2013), 1x Jrec. (Vodní hospodářství, 2014). Jeden článek je přijat k tisku v časopise s IF (Forest Pathology, DOI: 10.1111/efp.12185). V předkládaných výsledcích je jeden manuskript před odesláním do časopisu s IF (Forest Ecology & Management), který shrnuje výsledky celého výzkum faktorů ovlivňujících výskyt a význam nekrózy jasanu způsobené *H. fraxineus* na modelovém území Lužických hor.

5.1. Význam nekrózy jasanu v různých typech porostu

Invaze *Chalara fraxinea* v CHKO Lužické hory – předběžné výsledky výzkumu

Ludmila Havrdová a Karel Černý

2012

Acta Pruhoniciana 100: 137–145

Publikováno

INVAZE *CHALARA FRAXINEA* V CHKO LUŽICKÉ HORY – PŘEDBĚŽNÉ VÝSLEDKY VÝZKUMU

THE RESEARCH ON *CHALARA FRAXINEA* INVASION IN LUŽICKÉ HORY LANDSCAPE PROTECTED AREA – PRELIMINARY RESULTS

Ludmila Havrdová^{1), 2)}, Karel Černý^{1), 2)}

¹⁾ Výzkumný ústav Silva Taroucy pro krajinu a okrasné zahradnictví, v. v. i., Květnové nám. 391, 252 43 Průhonice, havrdova@vukoz.cz, cerny@vukoz.cz

²⁾ Česká zemědělská univerzita v Praze, katedra ochrany lesa a myslivosti, Kamýcká 129, 165 21 Praha 6-Suchbát, havrdova@fd.czu.cz, cerny@fd.czu.cz

Abstrakt

Nekróza jasanu způsobená invazním patogenem *Chalara fraxinea* představuje vážný problém v lesním hospodářství, vodním hospodářství a v ochraně přírody a krajiny. V modelovém území CHKO Lužické hory byl proveden výzkum sledující rozšíření původce choroby v různých typech porostů se zastoupením jasanu. Na území CHKO bylo prozkoumáno v roce 2011 v červenci až září 80 ploch rozdělených do 5 kategorií podle charakteru a četnosti výskytu jasanu na solitérní výskyt, roztroušený výskyt, břehový porost, jasanová olšina a lesní porost. Na výzkumných plochách byl hodnocen objem korun všech jasanů a procentuální poškození korun jednotlivých stromů způsobené *Ch. fraxinea*. Bylo zjištěno, že patogen *Chalara fraxinea* se vyskytuje v téměř 94 % zkoumaných ploch. Dále bylo zjištěno, že průměrná úroveň poškození porostů je 10,30 % (po přepočtu více než 4 100 m³/ha). Poškození jednotlivých kategorií porostů se mezi sebou statisticky průkazně lišilo – nejméně byly napadeny solitérní jasanové porosty a naopak nejvíce porosty břehové a jasanové olšiny.

Klíčová slova: *Chalara fraxinea*, *Hymenoscyphus pseudoalbidus*, *Fraxinus excelsior*, jasan ztepilý, nekróza jasanu

Abstract

Ash dieback caused by invasive pathogen *Chalara fraxinea* poses an important risk in forestry, water management and nature conservation and landscape protection. The investigation of distribution and impact of the disease in different types of vegetation was performed in Lužické hory protected landscape area. There were investigated 80 sites divided in 5 categories in July and September 2011, according to the type of vegetation and frequency of ash as follows: isolated trees in open landscape, scattered planting (and alleys), riparian stands, ash-alder alluvial forests and forest stands. It was found out that the pathogen *Chalara fraxinea* occurred in 94 % of surveyed areas. It was revealed that the average damage of stands was 10,30 % (the damage of crowns exceeded 4,100 m³/ha of ash forest after recalculation). The disease distribution was statistically different in the investigated stands: the isolated trees in open landscape and forest stands were less damaged compared to the most damaged riparian stands and ash-alder alluvial forests.

Key words: *Chalara fraxinea*, *Hymenoscyphus pseudoalbidus*, *Fraxinus excelsior*, common ash, ash dieback

ÚVOD

Chalara fraxinea – příčina nekrózy jasanu

V posledním desetiletí bylo v severovýchodní Evropě (Pobaltí, Polsko, Skandinávie) pozorováno nebezpečné hromadné odumírání jasanů, jehož původce byl poprvé identifikován v r. 2001 (Kowalski, 2001) a vědecky popsán pod jménem *Chalara fraxinea* Kowalski v r. 2006 (Kowalski, 2006). Během studie vývojového cyklu patogenu bylo zjištěno, že *Ch. fraxinea* může jako nepohlavní stadium patřit k běžnému helocíálnímu askomycetu *Hymenoscyphus albidus* (Roberge ex Desm.) W. Philips. Tento mikromycet je původním evropským druhem, jenž se běžně vyskytuje na opadu jasanu a jeho odumřelých výhonech (Kowalski, Holdenrieder, 2009b). Následující molekulární studie analyzující větší množství materiálu sebraného z opadu a izolovaného z nekrotických ovčím ukázala, že *Chalara fraxinea* náleží k novému kryptickému druhu – *Hyme-*

noscaphus pseudoalbidus V. Queloz, C. R. Grünig, R. Berndt, T. Kowalski, T. N. Sieber & O. Holdenrieder, 2010, který je morfologicky téměř totožný s výše zmíněným *Hymenoscyphus albidus* a výrazněji se liší jen některými molekulárními charakteristikami (mj. sekvencí ITS regionu rDNA) a virulencí vůči jasanu (Queloz et al., 2010). Studie rovněž potvrdila, že se tento patogen v Evropě vyskytuje už nejméně 30 let – z herbářových položek byl výskyt *H. pseudoalbidus* v Evropě (Švýcarsko) doložen ze 70. let minulého století. Patogen tehdy ale pravděpodobně nezpůsobil větší škody, a proto byl až dosud přehlížen (Queloz et al., 2010). Dalším důvodem, proč nebyl patogen donedávna zkoumán, může být skutečnost, že jasan není jako dřevina příliš ceněn, obvykle není určen k hospodářskému pěstování, používá se jako meliorační dřevina a větší roli hraje spíše v ochranných a v břehových porostech.

Patogen se rychle rozšířil do dalších částí Evropy, v současné době se vyskytuje v následujících státech: Rakousko, ČR,

Finsko, Francie, Německo, Maďarsko, Itálie, Litva, Nizozemí, Norsko, Polsko, Slovinsko, Švédsko, Dánsko, Estonsko, Lotyšsko, Švýcarsko (EPPO 2007, 2008a, b, 2010; Kirisits et al., 2009, 2010; Kowalski, Holdenrieder, 2009a; Ogris et al., 2009, 2010; Schumacher et al., 2010; Thomsen et al., 2007 aj.). Zjistilo se, že vlna epidemie se pohybuje Evropou od východu na západ, což je spolu s faktem, že *Fraxinus ornus* (jakožto více příbuzný asijským druhům jasanů) je odolnější vůči *C. fraxinea*, důvodem hypotézy, že patogen byl do Evropy zavlečen z Asie (Queloz et al., 2010). Z celoevropského hlediska je situace nejhorší pravděpodobně v Polsku a Pobaltí, kde se choroba vyskytuje ve větší intenzitě delší dobu než u nás a kde dochází k poškození velkých ploch výsadeb jasanu (např. Zachara et al., 2007).

V ČR byl patogen poprvé potvrzen r. 2007 (Arboretum Křtiny) a poté byl izolován na několika dalších lokalitách na jižní Moravě a Vysočině (Jankovský, Holdenrieder, 2009). Další rozšíření patogenu bylo izolačně potvrzeno v severovýchodních Čechách na cca deseti lokalitách na Semilsku, Trutnovsku, Náchodsku (Havrdová, unpubl.). Rozšíření tzv. nektrózy jasanu je ovšem výrazně širší – symptomy jsou popisovány v Praze, Beskydech, Jeseníkách, Krkonoších, východních a středních Čechách a jinde (Jankovský, Holdenrieder, 2009). Patogen se velmi pravděpodobně víceméně roztroušeně vyskytuje na většině území státu a jeho význam postupně narůstá. V ČR je v současné době výskyt patogenu znám z obou druhů původních jasanů *Fraxinus excelsior* a *F. angustifolia* (Jankovský, Holdenrieder, 2009).

Průběh choroby a její význam

Chalara fraxinea primárně napadá listy (zejména řapíky) a způsobuje nektrózy listů a jejich předčasný opad (Bakys et al., 2009). V letních měsících velmi pravděpodobně patogen invaduje hostitele v místě listových stop, pupenů, poranění a po sání a dále proniká do vnitřních pletiv výhonů a větví hostitele. Na napadených výhonech a větvích patogen způsobuje černavé léze, které se rychle prodlužují oběma směry, přičemž části pletiv již mohou nad nektrózou usychat. Během léta může hostitel oddělit napadenou část pletiv kalusem. Je pravděpodobné, že mycelium patogenu přežívá zimu v pletivech hostitele – patogen byl z napadených výhonů úspěšně izolován v lednu (Havrdová, unpubl.). V následujícím vegetačním období se pak patogen může dále pletivy šířit a rozsah napadení se může zvyšovat. Dále bylo zjištěno, že patogen přezimuje ve formě mycelia v řapících napadených a opadlých listů, na kterých se vytvářejí na jaře a v létě plodničky pohlavního stádia (apothecia) produkující množství askospor, které se šíří vzduchem a opětovně invadují hostitele (Timmermann et al., 2011). Snadné a rychlé šíření současné epidemie v Evropě podporuje domněnku, že se patogen šíří vzduchem (Kowalski, Holdenrieder, 2009b).

Patogenem jsou napadány stromy všech věkových kategorií na různých typech stanovišť – od přirozených lesů po komerční lesní výsadby a výsadby okrasné (Kirisits, Halmschlager, 2008; Kowalski, Lukomska, 2005). Sazenice a mladé výsadby jasanů jsou nektrózou jasanu poškozovány rychleji a ve větším rozsahu (mladé stromky mohou v důsledku napadení

odumřít i během jedné vegetační sezóny) než výsadby plně vzrostlé. U vzrostlých jedinců se choroba projevuje v první fázi mírným řidnutím koruny (lokální defoliací) a odumíráním výhonů (zpravidla přírůstku posledního roku). Hostitel na poškození patogenu reaguje tvorbou preventivních výhonů, které vytváří pod odumřelými částmi větví a postupně vzniká typické shlukovité olistění. Později dochází k intenzivnímu šíření patogenu v koruně hostitele, vedoucímu k masivnímu odumírání výhonů, drobných a později i kosterních větví a k rozsáhlému poškození. U značně poškozených stromů dosahuje proschnutí až 80–90 % objemu koruny. Takto poškozené stromy samozřejmě neplní svých funkcí a strom nakonec odumírá (Černý, 2011; Jankovský, Holdenrieder, 2009; Kowalski, Holdenrieder, 2009b).

Potenciální význam invaze v ochraně přírody a krajiny

Nebezpečnost patogenu a jeho rychlé šíření znepokojuje fytopatology a lesníky ve velké části Evropy. Obecně je pohled na další vývoj velmi skeptický a někteří autoři připouštějí i možnost kolapsu celých populací jasanu (např. McKinney et al., 2010). Vzhledem k rychlému šíření patogenu vzduchem na značné vzdálenosti je nepravděpodobné, že by postupu epidemie Evropou mohla zabránit fytoosanitární opatření (Queloz et al., 2010). Dosud známá nejsou ani ochranná opatření a o jejich účinnosti mnozí autoři pochybují mj. vzhledem k efektivnímu šíření patogenu vzduchem (např. Jankovský et al., 2009; Queloz et al., 2010).

Z výše zmíněného jednoznačně vyplývá fakt, že šíření patogenu a poškození porostů bude velmi obtížné nějakým způsobem regulovat. Z hlediska dlouhodobého hospodaření v krajině je ovšem důležité mít alespoň základní znalosti o průběhu invaze, invazibilitě různých typů porostů a o faktorech prostředí, které mohou k vyššímu riziku poškození přispívat. Vzhledem k široké ekologické valenci jasanu a jeho širokému použití lze očekávat, že invaze *Ch. fraxinea* pravděpodobně může způsobit problémy v celé řadě různých typů porostů a výsadeb.

Očekávat samozřejmě lze větší problémy ve výsadbách s vyšším zastoupením a významem jasanu, a to na vlhčích stanovištích v jasanovo-olšových luzích a v tvrdých luzích nížinných řek, obecně také v břehových porostech zejména středních poloh na drobnějších tocích s nezpěvnými břehy. Významným problémem bude obnova břehových porostů s dominantní olší, které jsou napadeny *Phytophthora alni* a kde jako odpovídající náhrada odumřelých olší často přicházel v úvahu jasan, nyní ale jeho výraznější použití bude nutno v důsledku invaze *Ch. fraxinea* revidovat (Černý, 2011). Dále lze předpokládat problémy v suťových lesích a v ochranných porostech na svazích. Význam epidemie způsobené *Ch. fraxinea* je už teď lokálně velmi výrazný i ve výsadbách ve volné krajině, kde je jasan často významnou složkou prvků ÚSES, a to nejen v břehových porostech, ale i stromoadících, remíztech a dalších roztroušené výsadbě. Mimo jiné lze předpokládat značný význam původce choroby zejména v mozaikovité, členité kulturní krajině středních poloh s významným podílem jasanu, jako je např. Verneřické středohoří nebo Růžovská vrchovina či Kytlická hornatina. Poškození jasanů lze ale čekat ve všech

typech společenstev a výsadeb, kde se jasan vyskytuje, a to zejména vzhledem ke snadnému šíření patogenu (Černý, 2011).

Tento článek si klade za cíl identifikovat rozdíly v intenzitě napadení různých typů porostů v krajině, ve kterých se jasan vyskytuje.

MATERIÁL A METODIKA

Cílem práce bylo potvrdit vliv a význam některých faktorů prostředí účastnících se na distribuci a rozsahu napadení hostitele původcem choroby – *Chalara fraxinea*. Práce by tak měla napomoci k řešení složité problematiky nekrózy jasanů a případně přispět k vytvoření managementu výsadby jasanů, a tím k zachování biodiverzity. Sledované faktory prostředí a znaky na hostitelských dřevinách byly získávány a jsou zpracovány v souladu s International Co-operative Programme on Assessment and Monitoring of Air Pollution Effects on Forest (Eichhorn et al., 2010), který sjednocuje metody sběru dat použitelných nejen pro hodnocení dopadu polutantů na lesní dřeviny, ale i dalších faktorů.

Modelové území, výběr výzkumných ploch

Pro průzkum bylo vybráno modelové území CHKO Lužické hory, které plně splňuje požadavky pro sběr dat. Populace patogenu je zde relativně ustálená (velmi hrubě lze odhadnout, že terénní sledování proběhlo přibližně 5 let po invazi *C. fraxinea*) a rozšířená po celém území. Jsou zde zastoupeny nejrozličnější typy porostů jasanu ve značném výškovém gradientu na relativně malém území. Mimo jiné je území CHKO geomorfologicky i vegetačně značně heterogenní. Území CHKO Lužické hory je lokalizováno mezi 50° 46'–50° 55' s. š. a 14° 25'–14° 52' v. d., rozkládá se na ploše 264 km² v nadmořských výškách mezi 312–793 m.

V různých částech území CHKO byly vybrány čtyři užší oblasti o ploše cca 20 km² respektující geomorfologickou a vegetační variabilitu území CHKO a zohledňující výskyt jasanu. Každá oblast pak byla rozdělena na 20 čtverců 1 × 1 km. V každém čtverci byla vybrána pouze jedna výzkumná plocha – kruh o poloměru 50 m. Výběr ploch byl prováděn tak, aby byla vzdálenost mezi sousedními plochami co největší – minimální vzdálenost byla 500 m, a to pouze v několika výjimečných případech. Standardní vzdálenost mezi sousedními plochami lze odhadnout na cca 700–800 m. Geomorfologie plochy byla homogenní a jasně definovaná, stejně tak jako typ (kategorie) porostu. Při výběru ploch bylo respektováno pravidlo, aby v každé oblasti byly rovnoměrně zastoupeny všechny definované kategorie porostů, a to pokud možno rovnoměrně na výškovém gradientu. Pokud ve čtverci nebyl nalezen žádný jasan, nebo porost neodpovídal příslušným parametrům (např. nedostatečná pokryvnost, významný antropogenní zásah do porostu atp.) byl vybrán jiný, přilehlý čtverec, dokud nebyla splněna metodika. Zároveň bylo pokud možno respektováno pravidlo, aby ve dvou sousedních čtvercích nebyl hodnocen porost stejné kategorie. Celkem bylo vybráno 80 výzkumných ploch, přičemž střed každé z nich

byl zaznamenán pomocí GPS (Garmin GPSMAP 62s) v souřadnicovém systému WGS-84 (tab. 1 na str. 122).

Sběr dat

Terénní průzkum proběhl během 10. 7. a 10. 9. 2011, terénní práce byly ukončeny ještě před výraznějším předčasným opadem listů způsobeným *Ch. fraxinea*, který by mohl ovlivnit výsledky. Na každé ploše bylo sledováno celkem 15 proměnných: objem nekrózy jasanu (závislá proměnná), 6 nezávislých proměnných popisujících výskyt a charakter hostitele a 8 nezávislých proměnných popisujících charakter prostředí. Mezi nezávislé proměnné byly zařazeny: lokalizace nekrózy jasanu, vzrůst stromu, objem koruny, zástin koruny, zdravotní stav, pokryvnost jasanu na ploše, okolní napadení hostitelé, typ porostu, zápoj porostu, popis vegetace a okolního prostředí, nadmořská výška, expozice terénu, sklon terénu a geomorfologie. Pro účel tohoto příspěvku budou blíže popsány pouze vyhodnocované znaky – tj. typ porostu, objem korun a nekróza jasanu.

Kategorie porostů

Vzhledem k ekologii a historickému používání jasanu na území CHKO se tato dřevina vyskytuje v nejrůznějších typech porostů od přirozených jasanových olšin, lužních a suťových lesů, přes více či méně umělé či samovolně z náletů vzniklé remízy a stromořadí ve volné krajině až po městské výsadby. Šíře výskytu jasanu v různých typech vegetace byla charakterizována pomocí pěti kategorií, z nichž každá respektuje určitý typ: solitérní výskyt v otevřené krajině, roztroušená výsadba (stromořadí) ve volné krajině, břehové porosty, jasan-olšové luh a lesní porosty. Porosty byly vybírány tak, aby bylo možné je celé jednoznačně přiřadit do konkrétní kategorie a aby byla pokud možno pokryta variabilita uvnitř jednotlivých kategorií co se týče reálného rozsahu zastoupení jasanu na daném typu stanovišť.

Solitérní výskyt. Jedná se o solitérní jedince ve venkovské krajině, kde pokryvnost jasanu na ploše činí cca 1–10 %; pokryvnost stromového patra na ploše max. 10 %; stromové patro chybí min. 30 m od kraje koruny měřeného jedince.

Roztroušená výsadba. Jedná se o skupiny a linie ve volné venkovské krajině (remízy, linie, okraje porostů, stromořadí), kde pokryvnost jasanu na ploše činí cca 3–20 %; celková pokryvnost stromového patra na ploše je 10–20 %.

Břehový porost. Jedná se o souvislé liniové břehové porosty (zhruba do 12 m celkové šířky) ve volné krajině, či v intravilánu obce, kde pokryvnost jasanu na ploše činí cca 5–30 %; celková pokryvnost stromového patra na ploše je 15–40 %.

Lesní porost. Jedná se o roztroušený výskyt až souvislý výskyt v lesních porostech (cesty, okraje porostů, drobné kotlíky) a v ochranných porostech, kde pokryvnost jasanu na ploše činí cca 2–100 %; celková pokryvnost stromového patra na ploše je 80–100 %.

Jasanová olšina. Jedná se o původní či sekundární jasan-olšový luh či údolní jasanovou olšinu, kde pokryvnost jasanu na ploše činí cca 10–50 % a celková pokryvnost stromového patra na ploše je 80–100 %.

Tab. 1 Přehled výzkumných ploch

Plocha č.	Lokalizace	Souřadnice	Nadmořská výška (m n. m.)
1	Kunratice u Cvikova	N 50°46.841', E 14°40.709'	352
2	Mařeničky, studánka	N 50°47.460', E 14°40.342'	370
3	Mařeničky, Třídómí	N 50°47.263', E 14°40.783'	371
4	Mařeničky, Svitávka	N 50°47.893', E 14°40.315'	348
5	Mařeničky, hřbitov	N 50°47.766', E 14°40.716'	420
6	Mařenice, ZD	N 50°48.344', E 14°40.895'	396
7	Mařenice, Svitávka	N 50°48.664', E 14°40.345'	407
8	Drnovec, Zelený vrch	N 50°46.805', E 14°39.392'	468
9	Cvikov, léčebna	N 50°47.265', E 14°38.746'	420
10	Trávník	N 50°47.944', E 14°39.051'	400
11	Naděje	N 50°48.613', E 14°39.093'	418
12	Naděje, Hamr	N 50°48.944', E 14°39.351'	433
13	Mařenice, Soví vrch	N 50°48.837', E 14°40.402'	406
14	Mařenice, sev. Svitávka	N 50°48.881', E 14°40.327'	404
15	Luž	N 50°50.365', E 14°39.044'	602
16	Juliova	N 50°49.797', E 14°39.867'	492
17	Dolní Světlá	N 50°49.899', E 14°39.738'	497
18	Dolní Světlá, PR Brazílka	N 50°50.433', E 14°39.870'	489
19	Krompach, Krompašský potok	N 50°49.438', E 14°40.653'	444
20	Cvikov, Boží muka	N 50°47.375', E 14°38.676'	478
21	Líska, Černá hora	N 50°50.341', E 14°28.023'	525
22	Líska, jz. Studenec	N 50°49.628', E 14°26.673'	479
23	Líska, Studenec	N 50°49.937', E 14°27.279'	735
24	Líska, Sedlo pod Studencem	N 50°49.912', E 14°28.061'	631
25	Líska, Zlatý vrch	N 50°49.519', E 14°27.950'	568
26	Líska, Lipnický vrch	N 50°49.492', E 14°26.491'	486
27	Líska, hřiště	N 50°49.432', E 14°27.223'	496
28	Česká Kamenice, Chřibská Kamenice	N 50°48.010', E 14°25.804'	301
29	Horní Kamenice, Chřibská Kamenice	N 50°48.150', E 14°26.434'	317
30	Líska, jih obce	N 50°48.997', E 14°26.939'	438
31	Dolní Prysk, Střední vrch	N 50°48.504', E 14°28.124'	424
32	Horní Kamenice, Lísecký potok	N 50°48.567', E 14°26.484'	365
33	Křížový Buk, Javor	N 50°49.564', E 14°29.664'	555
34	Kytlice, Mlýny	N 50°48.608', E 14°30.129'	393
35	Kytlice, PR Kytlice	N 50°48.122', E 14°32.443'	513
36	Kytlice, kosrel	N 50°48.710', E 14°32.189'	473
37	Horní Kamenice, Břidličný vrch	N 50°48.192', E 14°27.026'	344
38	Kytlice, Lomy	N 50°48.840', E 14°30.592'	419
39	Kytlice, Falknov	N 50°48.505', E 14°31.763'	491
40	Kytlice, obec	N 50°49.005', E 14°31.662'	474
41	Doubice, PR Spravedlnost	N 50°52.674', E 14°27.885'	419
42	Nová Doubice	N 50°53.020', E 14°28.225'	454
43	Doubice, jih obce	N 50°53.177', E 14°27.327'	388
44	Doubice, hájenka	N 50°53.659', E 14°27.340'	413
45	Doubice, Doubický potok	N 50°53.548', E 14°27.848'	426

Plocha č.	Lokalizace	Souřadnice	Nadmořská výška (m n. m.)
46	Doubice, PR Vápenka	N 50°53.770', E 14°28.757'	494
47	Chřibská, Liščí Bělídlo	N 50°52.587', E 14°28.744'	394
48	Chřibská, PR Louka u Brodských	N 50°52.102', E 14°28.539'	333
49	Chřibská, ZD	N 50°51.675', E 14°28.397'	349
50	Dolní Chřibská, Výslunní	N 50°52.179', E 14°27.157'	353
51	Chřibská, Pařez	N 50°52.275', E 14°27.948'	338
52	Dolní Chřibská, akvadukt	N 50°51.644', E 14°26.798'	305
53	Chřibská, obec	N 50°51.730', E 14°28.807'	343
54	Kyjov, ZD	N 50°54.518', E 14°28.165'	417
55	Hely, křížek	N 50°54.616', E 14°28.589'	442
56	Hely	N 50°54.806', E 14°28.518'	408
57	Kyjov, Křínický potok	N 50°54.973', E 14°28.359'	384
58	Doubice, kaplička	N 50°52.991', E 14°27.628'	405
59	Krásná Lípa, park	N 50°54.384', E 14°29.988'	447
60	Nová Chřibská	N 50°52.244', E 14°29.675'	406
61	Heřmanice v Podještědí, Jezevčí vrch	N 50°47.461', E 14°42.279'	655
62	Heřmanice v Podještědí, jih obce	N 50°47.068', E 14°44.302'	361
63	Heřmanice v Podještědí, Na Šestce	N 50°48.864', E 14°44.387'	470
64	Petrovice, Sokol	N 50°48.459', E 14°44.974'	593
65	Petrovice, Vápenka	N 50°49.454', E 14°45.352'	437
66	Petrovice, ZD	N 50°48.344', E 14°45.500'	405
67	Petrovice, pramen	N 50°48.692', E 14°46.527'	387
68	Petrovice, hájenka	N 50°48.838', E 14°45.998'	381
69	Petrovice, Kněžický potok	N 50°48.107', E 14°45.996'	353
70	Petrovické domky	N 50°47.915', E 14°44.811'	375
71	Kněžice	N 50°47.639', E 14°46.168'	346
72	Kněžičky, Kněžický potok	N 50°46.929', E 14°46.327'	313
73	Kunratické domky	N 50°46.697', E 14°43.244'	365
74	Lada v Podještědí	N 50°46.708', E 14°44.769'	330
75	Kunratické domky, Dubina	N 50°47.033', E 14°42.876'	393
76	Heřmanice v Podještědí, Kamenný vrch	N 50°48.153', E 14°43.433'	421
77	Lada v Podještědí, rybník	N 50°46.508', E 14°44.883'	312
78	Lada v Podještědí, Heřmanický potok	N 50°46.878', E 14°44.485'	326
79	Heřmanice v Podještědí, kostel	N 50°47.588', E 14°43.840'	355
80	Krompach, Hvozď	N 50°49.572', E 14°44.215'	607

Objem korun

Objem koruny je proměnná popisující množství kolonizovatelného substrátu (za zjednodušeného předpokladu homogenního zavětvění a olistění všech jedinců) a je pro vyhodnocení skutečného rozsahu poškození velmi významnou veličinou. Je zároveň zřejmé, že velmi proměnlivou realitu porostů nelze plně postihnout, proto bylo nutno akceptovat jistá zjednodušení, které ovšem při použití standardizovaných postupů mají proporcionálně stejný dopad u všech zkoumaných porostů.

Vzhledem k tomu, že se v jednotlivých porostech vyskytova-

li jedinci nejrůznějšího vzrůstu a tvaru včetně zmlazení, byl objem korun jednotlivých stromů na všech plochách počítán zvlášť. Protože se tvar korun jasanů různí, byl i tento faktor zahrnut při výpočtech. V dokonalém zápoji vytváří jasan přímý kmen a štíhlou, poměrně řídkou vejcovitou korunu (Wardle, 1961), v řídkém zápoji jasan korunu více rozkládá a ve vrcholu často vidličnatí (Vyskot, 1978) a její tvar tudíž může být kulovitý, vejcovitý až zaoblený. Zjednodušeným způsobem byl měřen objem jasanového zmlazení, které bylo potřeba do výpočtu rovněž zahrnout.

Pro výpočet objemu koruny (V) byla měřena výška koruny

(v) a průměr koruny ve dvou kolmých směrech (d_1, d_2). Výška koruny (v) byla měřena výškoměrem Nikon Forestry 550 v metrech od prvního větvení k nejvyššímu bodu koruny. Šířka koruny byla měřena ve dvou na sebe kolmých směrech (d_1, d_2), měřeno krokováním s přesností na 0,5 m. U vejcovité koruny (elipsoidu) je výška koruny větší než její průměr ($v > (d_1, d_2)/2$), u kulovité koruny se výška koruny rovná průměru ($v = (d_1, d_2)/2$), u polokulovitých tvarů je výška menší než průměr ($v < (d_1, d_2)/2$). Proto byly pro výpočty objemů korun různých tvarů použity následující vzorce: pro výpočet objemu vejcovité a kulovité koruny byl použit vzorec $V = 4/3\pi v d_1 d_2$ a pro výpočet objemu zaoblené koruny $V = 2/3\pi v d_1 d_2$. V případě homogenního porostu jasanového zmlazení bylo na prostor souvisejících korun sousedních jedinců nahlíženo pro zjednodušení jako na kvádr. V tomto případě byly měřeny šířka a délka porostu krokováním nebo dálkoměrem Nikon Forestry 550 a jeho průměrná výška (eventuálně průměrná výška korun). Výpočet objemu korun homogenního porostu pak proběhl podle vzorce $V = v d_1 d_2$.

Objem korun jednotlivých jedinců (včetně zmlazení) byl pak na celé ploše sečten.

Nekróza jasanu

Na sledovaných stromech a porostech byl opticky ověřen výskyt typických symptomů nekrózy jasanu (případně za použití dalekohledu). Dále bylo zjištěno procento prosychání koruny způsobené *Ch. fraxinea* vyjádřené podílem suchých a odlisťných částí koruny ve srovnání se zdravým stromem. Pro hodnocení nekrózy koruny jasanů byla použita metoda „foliage transparency“ dle ICP Forest 2010 (Eichhorn et al., 2010), která určuje množství světla prostupující korunou v procentech, oproti množství světla prostupující korunou plně olistěnou. Jako kalibrace bylo pro vizuální hodnocení prosychání koruny použito práce Smitley (2008). Prosychání $>10\%$ bylo hodnoceno v desítkách procent a prosychání $<10\%$ bylo podrobněji rozděleno do hodnot 5 a 2%. Všechny plochy byly vyhodnocovány jedním výzkumníkem (první autor), aby byla vyloučena chyba rozdílného subjektivního hodnocení podílu poškození.

Na prosychání jasanu měly vliv i další faktory, které byly při hodnocení rozsahu nekrózy jasanu identifikovány, ale do odhadu hodnoty tohoto znaku nebyly v souladu s ICP Forest 2010 (Eichhorn et al., 2010) zahrnovány. Jedná se o taková místa, kde bylo postrádáno očekávané olistění z jiného důvodu než infekce *Ch. fraxinea* (srv. Tallent-Halsell, 1994). Mezi takové faktory patřily např. následující: prosychání koruny způsobené přirozeným způsobem (zápoj, zastínění, stáří, mechanické poškození – zlomené, odřené, suché, či zcela chybějící větve, atp.), odlisťnění způsobené sezónním žírem, částečná redukce olistění v souvislosti s enormní plodností některých jedinců, poškození jinými patogeny a škůdci – identifikovány např. *Leperisinus fraxini*, *Nectria galligena*, *Pseudomonas savastanoi* pv. *fraxini*. (Havrdová, Černý, unpubl.), popř. vytloukání v mlazinách. Poškození jiného druhu než *Ch. fraxinea* byla evidována v proměnné zdravotní stav.

Statistické vyhodnocení

Data byla vyhodnocena ve statistickém balíku Statistica 9.0 (Statsoft, Inc. Tulsa, OK). Při hodnocení normality rozložení dat v jednotlivých skupinách dat bylo zjištěno, že některé skupiny dat nesplňují toto rozdělení (Lilieforsův test, $p < 0,05$). Hodnoty proměnných objem nekrotizovaných korun a podíl nekrotizovaných korun byly transformovány – první proměnná byla zlogaritmována, druhá byla transformována pomocí arcsinové transformace (Hendl, 2006). Po transformaci bylo zjištěno, že jedna skupina dat (kategorie soliterní výskyt) stále nesplňuje požadavky na normalitu (Lilieforsův test, $p < 0,01$), a proto byla data zpracována neparametrickým Kruskal-Wallisovým testem.

VÝSLEDKY

V průběhu terénního šetření bylo zjištěno, že jasan je v CHKO Lužické hory hojně zastoupen ve všech pěti definovaných kategoriích porostů. Zastoupení jasanu v jednotlivých kategoriích ovšem kolísalo – nejnižší četnosti byly zjištěny v kategorii soliterní výskyt a břehový porost. V prvním případě to bylo ovlivněno faktem, že přes četný výskyt samostatně rostoucích jedinců nesplňovalo mnoho z nich základní definici kategorie (stromy rostly příliš blízko u sebe) a spadaly tak podle definice obvykle do kategorie roztroušený výskyt. V případě břehových porostů to bylo způsobeno tím, že správce vodních toků v ohlasi (Povodí Ohře, s. p.) posledních několik let intenzivně kácí napadené břehové porosty s vyšším výskytem patogenů *Ch. fraxinea* a *Phytophthora alni* (Klíma, pers. com.) a z důvodu povodní v posledních letech. Přes tato omezení se podařilo bez problémů nalézt potřebné počty výzkumných ploch ve všech kategoriích s výjimkou jasanových olšin. Jejich relativně slabší zastoupení velmi pravděpodobně souvisí s geomorfologií území (relativně úzká údolí), dlouhodobě hustým osídlením a vysokým tlakem na zemědělské využívání rovinatých niv kolem potoků, v jehož důsledku došlo k ústupu těchto společenstev.

Jednotlivé kategorie se výrazně lišily v průměrném objemu korun jasanů v závislosti na pokrývnosti jasanu a vzrůstu výsadeb. Nejmenší průměrné objemy korun jasanů byly zjištěny v kategorii soliterní výskyt ($16\,840,55\text{ m}^3$), největší pak v kategoriích břehový porost ($46\,477,70\text{ m}^3$) a jasanová olšina ($36\,844,79\text{ m}^3$; tab. 2).

Na základě průzkumu 80 ploch pokrývajících velkou část území CHKO Lužické hory bylo zjištěno, že je patogen na území značně rozšířen a choroba, kterou způsobuje, byla identifikována v 75 z 80 zkoumaných ploch (93,75 %). Pět ploch, na kterých výskyt choroby zaznamenán nebyl, patřilo do kategorie soliterní výskyt.

Při hodnocení proměnné celkový objem nekrózy v porostu bylo zjištěno, že průměrné poškození porostů jasanů dosahuje v CHKO Lužické hory $3\,254\text{ m}^3$ (rozsah 0,00–23 157, 28) na výzkumnou plochu (tj. kruh o průměru 100 m = $7\,854\text{ m}^2$). Po přepočtu dosahuje průměrné napadení zkoumaných porostů jasanů v CHKO Lužické hory $4\,143,11\text{ m}^3/\text{ha}$ porostu. Průměr-

ná úroveň poškození porostů je 10,30% (rozsah 0,00–30,58).

Nejmenší objemy poškození lze identifikovat v kategoriích soliterní výskyt, kde bylo poškozeno v průměru 4 64,87 m³/plocha (rozsah 0–1225,02), což představuje 4,42% objemu korun jasanů (rozsah 0,00–8,28% s extrémní hodnotou 29,97%). Poměrně málo se nekróza jasanu vyskytuje i v lesních porostech – průměrný objem poškození činil 1 192,59 (rozsah 121,5–2544,39) m³/plocha což vztaheno k celkovému objemu představuje v průměru 5,50% (rozsah 0,47–12,60). Největší objemy poškození se vyskytují v břehových porostech, kde je poškozeno v průměru 6 617,96 (1 265,43–2 3157,28) m³/plocha, což vztaheno k celkovému objemu korun představuje poškození 15,22% (rozsah 7,42–26,50; Graf 1, 2).

Při přepočtu na 1 ha plochy lze konstatovat následující. V kategorii soliterní výskyt bylo poškozeno v průměru 591,89 m³/ha, v kategorii lesní porost 1 518,45 m³/ha a v kategorii roztroušená výsadba 2 985,31 m³/ha. Naproti v kategorii jasanová olšina bylo poškozeno 6 852,89 m³/ha a v kategorii břehový porost dokonce 8 426,23 m³/ha. Uváděné údaje mohou být samozřejmě zatíženy subjektivní chybou vzniklou při hodnocení procenta prosychání, nicméně tato chyba je proporcionálně stejná u všech kategorií.

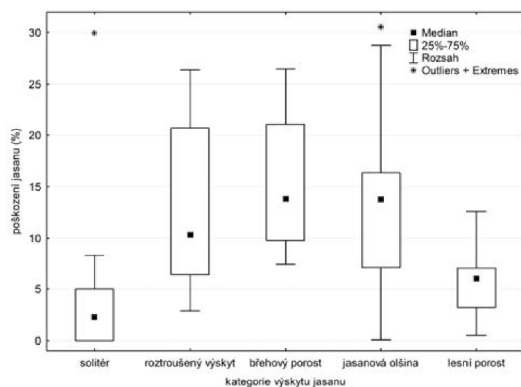
Největší relativní poškození v rámci jednoho porostu bylo zjištěno u jasanové olšiny (porost 56, Hely), kde bylo poškozeno 30,58% objemu korun jasanů (v reálu poškození činilo 19 463,27 m³), absolutně nejvyšší hodnoty byly zjištěny v břehovém porostu Křinického potoka (porost 57, Kyjov) a činily 23 157,28 m³ (průměrné poškození na ploše činilo 22,54%).

Napadení porostů výrazně kolísá mezi jednotlivými kategoriemi porostů. Z výsledků vyplývá, že se poškození jednotlivých kategorií porostů mezi sebou průkazně liší – a to jak v proměnné celkový objem nekrózy v porostu, tak v proměnné podíl nekrózy na objemu korun porostu ($p < 0,01$, tab. 2). Lze jednoznačně říci, že v CHKO Lužické hory jsou průkazně nejméně napadeny soliterní jasanové a porosty lesní a naopak nejvíce jsou napadeny porosty břehové a jasanové olšiny ($p < 0,01$).

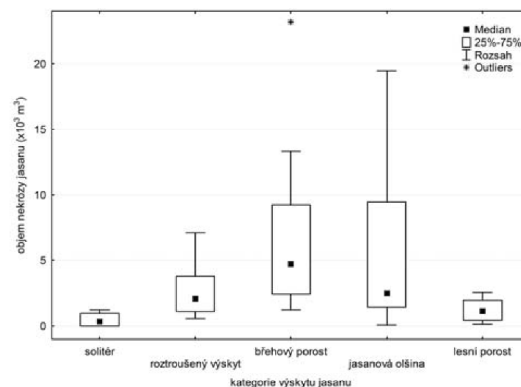
DISKUZE

Rozšíření patogenu a jím způsobené choroby ve sledovaném území je poměrně značné – průměrné poškození sledovaných porostů jasanů je 10,30% (maximální zjištěná hodnota je 30,58%). Tato hodnota je relativně značně vysoká s ohledem

Graf 1 Procentuální poškození jasanu patogenem *Chalara fraxinea* v různých kategoriích porostů v CHKO Lužické hory



Graf 2 Objem nekrózy jasanu způsobené *Chalara fraxinea* v různých kategoriích porostů v CHKO Lužické hory



Tab. 2 Objem korun jasanů, objem nekrózy jasanu a její procentuální podíl (aritmetický průměr spočtený přes plochy v kategoriích) ve sledovaných kategoriích porostů jasanu v CHKO Lužické hory. N: počet měření, SE: střední chyba průměru; vícenásobné porovnání: hodnoty označené stejným indexem nejsou statisticky průkazně odlišné

Kategorie porostu	N	Průměrný objem korun jasanů (±SE) (m ³)	Průměrný objem nekrózy jasanu (±SE) (m ³)	Podíl nekrózy jasanu (±SE) (%)
Soliterní výskyt	16	16840,55	464,87 (±117,73)a	4,42 (±1,83)a
Roztroušený výskyt	18	25070,44	2920,71 (±535,98)b,c	12,41 (±1,76)b,c
Břehový porost	16	46477,70	6617,96 (±1428,22)c	15,22 (±1,61)c
Jasanová olšina	14	36844,79	5382,26 (±1468,35)b,c	14,14 (±2,37)c
Lesní porost	16	28985,44	1192,59 (±203,92)a,b	5,50 (±0,83)a,b
Průměr (CHKO)	80	30837,78	3254,14 (±474,36)	10,30 (±0,90)

na fakt, že patogen byl ve studovaném území detekován poprvé v r. 2009 (Černý, unpubl.) a v ČR v r. 2007 (Jankovský, Holdenrieder, 2009). To sice mohlo být způsobeno částečně přehlížením problému, ale nepochybně to rovněž souvisí s mnohokrát zmiňovanou rychlostí invaze a s faktem, že se *Ch. fraxinea* velmi pravděpodobně šíří vzduchem (např. Kowalski, Holdenrieder, 2009b; Queloz et al., 2010). Patogen byl ve sledovaném území zjištěn ve všech kategoriích výsadeb a téměř v 94 % zkoumaných ploch, což je v souladu např. s výsledky Kiritse a Halmshlagera (2008) a Kowalského a Lukomské (2005). Tento fakt ve spojitosti s náhlým vzestupem choroby opět podporuje teorii o šíření patogenu vzduchem.

Na druhou stranu se ukázalo, že napadení jasanů v různých kategoriích porostů průkazně kolísá – nejmenší podíl napadení byl zjištěn v kategorii solitérní výskyt a lesní porost, největší pak v kategorii břehový porost a jasanová olšina. To může souviset samozřejmě s celou řadou faktorů – např. s celkovým objemem korun jasanů na ploše, který je u nejvíce poškozených kategorií vyšší (viz tab. 2). Lze předpokládat, že mezi objemem korun jasanů a četností výskytu choroby existuje pozitivní závislost. Objem korun odpovídá množství kolonizovatelného substrátu – jinak také receptivní ploše, na které se mohou zachytit askospory šířící se vzduchem. Objem korun rovněž koresponduje s množstvím opadlého substrátu, na kterém patogen pravděpodobně dokončuje vývoj. Askospory uvolněné z apothecií narostlých na opadlých řapících slouží jako primární infekční inoculum, kterým jsou dále infikovány listy a výhony v korunách (Timmermann et al., 2011). Pokud by tato skutečnost byla potvrzena, bylo by možné uvažovat o silné pozitivní zpětné vazbě a rychlém nárůstu poškození porostu (kdy by byly nejvíce postiženy spodní části korun), protože lze předpokládat, že největší množství infekčního inocula bude zachyceno v krátké vzdálenosti od jeho zdroje (Malloch, Blackwell, 1992).

Dalším faktorem, který mohl být příčinou vyššího napadení jasanových olšin a břehových porostů, je fakt, že jsou více vázány na vlhké prostředí. Délepretrvávající vlhkost prostředí může chránit spory před vyschnutím a stimulovat klíčení (Timmermann et al., 2011), může tak dojít rychlejšímu rozvoji choroby, podobně jako např. u antraknózy platanu a jiných chorob listů a výhonů (Sinclair et Lyon, 2005). Vyšší vlhkost prostředí může rovněž být ovlivněna vyšším zápojem stromového patra na ploše a v jejím okolí a geomorfologií terénu. Vyšší zápojem vícedruhového porostu (např. v lesních porostech či jasanových olšinách) může ovšem na druhou stranu teoreticky snížit pravděpodobnost uchycení patogenu na ploše (askospory patogenu mají menší pravděpodobnost, že dopadnou na vhodný substrát). Vliv na uchycení patogenu může mít např. také expozice a relativní nadmořská výška aj.

Metodika výběru lokalit byla sice nastavena tak, aby pokud možno nedocházelo k velkému zkreslení v důsledku působení tohoto faktoru, nicméně byla vždy identifikována nejbližší ohniska výskytu choroby v okolí sledovaných ploch, jejich vzdálenost a směr.

Všechny výše zmíněné a některé další faktory byly při terénním sběru dat zohledněny a jejich variabilita byla zaznamenána. Jejich vyhodnocení proběhne v následujících měsících.

ZÁVĚR

Na základě průzkumu 80 porostů reprezentujících celou škálu výskytu jasanu na území CHKO Lužické hory bylo zjištěno, že patogen *Chalara fraxinea* je na území značně rozšířen a choroba, kterou způsobuje – nektróza jasanu – se vyskytuje v téměř 94 % zkoumaných ploch. Dále bylo zjištěno, že průměrná úroveň poškození porostů je 10,30 %, což je vzhledem ke krátké době od počátku invaze alarmující hodnota. Bylo zjištěno, že průměrné poškození korun jasanů na zkoumaných plochách dosáhlo 4 143,11 m³ na 1 ha porostu. Nejmenší objemy poškození lze identifikovat v kategorii solitérní výskyt, kde bylo poškozeno v průměru 591,89 m³/ha (4,42 % celkového objemu korun). Poměrně málo se nektróza jasanu vyskytovala i v lesních porostech – průměrný objem poškození činil 1 518,45 m³/ha (5,50 %). Největší objemy poškození byly identifikovány v jasanových olšinách: 6 852,89 m³/ha (14,14 %) a v břehových porostech, kde poškození dosáhlo v průměru 8 426,23 m³/ha (15,22 %).

Poškození jednotlivých kategorií porostů se mezi sebou průkazně liší ($p < 0,01$) a lze jednoznačně říci, že v CHKO Lužické hory jsou nejméně napadeny solitérní jasanové a lesní porosty a naopak nejvíce jsou napadeny porosty břehové a jasanové olšiny ($p < 0,01$).

Práce na projektu budou dále pokračovat – v následujícím období budou zkoumány faktory prostředí, které mohly ovlivnit intenzitu choroby v různých typech porostů.

Poděkování

Práce byla podpořena projekty Ministerstva zemědělství České republiky č. NAZV QI92A207 a Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy č. ČZU IGAFD201113. Dále bychom chtěli poděkovat za spolupráci SCHKO Lužické hory, zejména pak ing. Alexandru Hrozkovi za veškerou pomoc při průzkumu území a SCHKO Labské pískovce.

LITERATURA

- Bakys, R., Vasaitis, R., Barklund, P., Ihrmark, K., Stenlid, J. (2009): Investigations concerning the role of *Chalara fraxinea* in declining *Fraxinus excelsior*. *Plant Pathology*, vol. 58, p. 284–292.
- Černý, K. (2011): Nebezpečné patogeny lesních dřevin *Phytophthora alni* a *Chalara fraxinea*: rozšíření, význam a možná rizika vyplývající z jejich zdomácnění. *Zpr. Ochr. Lesa*, č. 15, s. 71–75.
- Eichhorn, J., Roskams, P., Ferretti, M., Mues, V., Szepesi, A., Durrant, D. (2010): International Co-operative Programme on Assessment and Monitoring of Air Pollution Effects on Forest (ICP Forest), part IV Visual Assessment of Crown Condition and Damaging Agents. Hamburg, UNECE ICP Forest Programme Co-ordinating Centre, 47 p.

- EPP0 (2007): Ash dieback in Europe and possible implication of *Chalara fraxinea*. Addition to the EPP0 Alert List. EPP0 Reporting Service 2007/179.
- EPP0 (2008a): First report of *Chalara fraxinea* in Norway. EPP0 Reporting Service 2008/181.
- EPP0 (2008b): First report of *Chalara fraxinea* in Finland. EPP0 Reporting Service 2008/182.
- EPP0 (2010): *Chalara fraxinea*, Ash dieback. EPP0 Reporting Service [online]. October 2011 [cit. 2011-10-17], dostupné na : <http://www.eppo.org/QUARANTINE/Alert_List/fungi/Chalara_fraxinea.htm>.
- Hendl, J. (2006): Přehled statistických metod zpracování dat. 2. vydání. Praha, Portál, 583 s., ISBN 80-7367-123-9.
- Jankovský, L., Holdenrieder, O. (2009): *Chalara fraxinea* – Ash Dieback in the Czech Republic. Plant Prot. Sci., vol. 45, p. 74–78.
- Jankovský, L., Štátný, P., Palovčíková, D. (2009): Nekróza jasanu *Chalara fraxinea* v ČR. Les. Práce, č. 88, s 16–17.
- Kirisits, T., Halmeschlager, E. (2008): Eschenpilz nachgewiesen. Forstzeitung, vol. 2, p. 32–33.
- Kirisits, T., Matlakova, M., Mottinger-Kroupa, S., Cech, T. L., Halmeschlager, E. (2009): The current situation of ash dieback caused by *Chalara fraxinea* in Austria. In Doğmuş-Lehtijärvi, T. [ed.]: Proceedings of the conference of IUFRO working party 7.02.02. Foliage, shoot and stem diseases of forest trees. Eğirdir, Turkey, May 11-16 2009. SDU Faculty of Forestry Journal, ISSN: 1302-7085, Seriál: A, Special Issue: 97–119.
- Kirisits, T., Matlakova, M., Mottinger-Kroupa, S., Halmeschlager, E., Lakatos, F. (2010): *Chalara fraxinea* associated with dieback on narrow-leaved ash (*Fraxinus angustifolia*). Plant Pathology, vol. 59, p. 411.
- Kowalski, T. (2001): O zamieraniu jesionów [About ash dieback]. Trybuna Leśnika, vol. 4, p. 6–7.
- Kowalski, T. (2006): *Chalara fraxinea* sp. nov. associated with dieback of ash (*Fraxinus excelsior*) in Poland. Forest Pathology, vol. 36, p. 264–270.
- Kowalski, T., Holdenrieder, O. (2009a): Pathogenicity of *Chalara fraxinea*. Forest Pathology, vol. 39, p. 1–7.
- Kowalski, T., Holdenrieder, O. (2009b): The teleomorph of *Chalara fraxinea*, the causal agent of ash dieback. Forest Pathology, vol. 39, p. 304–308.
- Kowalski, T., Łukomska, A. (2005): The studies on ash dying (*Fraxinus excelsior* L.) in the Włoszczowa Forest Unit stands. Acta Agrobotanica, vol. 59, p. 429–440.
- Malloch, D., Blackwell, M. (1992): Dispersal of fungal diaspores. In Carroll G. C., Wicklow D. T. [eds.]: The Fungal Community. New York, USA, Marcel Dekker, p. 147–171.
- McKinney, L. B. V., Nielsen, L. R., Hansen, J. K., Kjær, E. D. (2010): Presence of natural genetic resistance in *Fraxinus excelsior* (Oleraceae) to *Chalara fraxinea* (Ascomycota): an emerging infectious disease. Hereditas [online]. October 2011 [cit. 2011-10-17], dostupné na: <<http://www.nature.com/hdy/journal/v106/n5/full/hdy2010119a.html>>, doi:10.1038/hdy.2010.119.
- Ogris, N., Hauptman, T., Jurc, D. (2009): *Chalara fraxinea* causing common ash dieback newly reported in Slovenia. Plant Pathology, vol. 58, p. 1173.
- Ogris, N., Hauptman, T., Jurc, D., Floreancig, V., Marsich, F., Montecchio, L. (2010): First Report of *Chalara fraxinea* on Common Ash in Italy. Plant Disease, vol. 94, p. 133.
- Queloz, V., Grünig, C. R., Berndt, R., Kowalski, T., Sieber, T. N., Holdenrieder, O. (2010): Cryptic speciation in *Hymenoscyphus albidus*. Forest Pathology, vol. 41, p. 133–142.
- Schumacher, J., Kehr, R., Leonhard, S. (2010): Mycological and histological investigations of *Fraxinus excelsior* nursery saplings naturally infected by *Chalara fraxinea*. Forest Pathology, vol. 40, p. 419–429.
- Sinclair, W. A., Lyon H. H. (2005): Diseases of trees and shrubs. Second edition. Ithaca, New York, Cornell University Press, 660 p., ISBN 978-0-8014-4371-8.
- Smitley, D. (2008): Four-year test shows that an annual basal drench with imidacloprid protects trees from emerald ash borer. Integrated Pest Management Resources [online]. October 2011 [cit. 2011-10-17], dostupné na: <<http://www.ipm.msu.edu/cat08land/105-16-08.htm>>.
- Tallent-Halsell, N. G. (1994): Forest Health Monitoring. Field Methods Guide 1994 [online]. U.S. Washington, D.C. 1994 [cit. 2011-10-17]. Environmental Protection Agency EPA/620/R-94/027, 267 p. Dostupné na: <<http://nepis.epa.gov/Exec>>.
- Thomsen, I. M., Skovsgaard, J. P., Barklund, P., Vasaitis, R. (2007): Svampesygdom er arsağ il toptorre i ask. Skoven (Skov & Landskab; Kobenhavns Universitet, Copenhagen, DK), vol. 5, p. 234–236.
- Timmermann, V., Borja, I., Hietalal, A. M., Kirisits, T., Solheim, H. (2011): Ash dieback: pathogen spread and diurnal patterns dispersal, with special emphasis to Norway. Bulletin OEPP/EPP0 Bulletin, vol. 41, p. 14–20.
- Vyskot, M. (1978): Pěstění lesů. Praha, SZN, 448 s.
- Wardle, P. (1961): Biological flora of the British Isles. *Fraxinus excelsior* L. Journal of Ecology, vol. 49, p. 739–751.
- Zachara, T., Zajaczkowski, J., Łukaszewicz, J., Gil, W., Paluch, R. (2007): Possibilities for prevention of ash decline by silvicultural methods (in Polish). Leś. Pr. Badaw., vol. 3, p. 149–150.

Rukopis doručen: 18. 10. 2011
Přijat po recenzi: 15. 1. 2012

5.2. Vlhkost vzduchu ovlivňuje intenzitu napadení jasanu

Význam vlhkosti vzduchu v epidemiologii nekrózy jasanu – předběžné výsledky

Ludmila Havrdová a Karel Černý

2013

Zprávy lesnického výzkumu, 58, 2013 (4): 347 – 352

Publikováno

VÝZNAM VLHKOSTI VZDUCHU V EPIDEMIOLOGII NEKRÓZY JASANU – PŘEDBĚŽNÉ VÝSLEDKY

THE IMPORTANCE OF AIR HUMIDITY IN ASH DIEBACK EPIDEMIOLOGY – PRELIMINARY RESULTS

LUDMILA HAVRDOVÁ^{1,2)} - KAREL ČERNÝ²⁾¹⁾ Česká zemědělská univerzita v Praze, Fakulta lesnická a dřevařská, Praha²⁾ Výzkumný ústav Silva Taroucy pro krajinu a okrasné zahradnictví, v. v. i., Průhonice

ABSTRACT

The aim of the article is the investigation of potential importance of air humidity in ash dieback epidemiology. The investigation linked up to the previous investigation of the disease impact in different types of ash vegetation in the Lusatian Mountains Protected Landscape Area, Czech Republic. The sensors Datalogger Minikin THi (EMS Brno) measuring the air humidity were installed in 50 permanent plots respecting the diversity of ash stands in the area. The air humidity was measured 4.5 m above ground level in the centre of research plots. The data were recorded in 15-min intervals during June and August 2012 (the main period of ascospore spread). The data were compared to extent of damage caused by ash dieback in research plots. It was found out that the average air humidity statistically differed among vegetation types and corresponded to the disease impact. The highest level of air humidity was in riparian stands and in ash-alder mixed alluvial forest – i.e. in vegetation types with the highest disease impact. The lowest air humidity was recorded in isolated trees in open landscape, which were the less affected category of ash vegetation. Moreover, the statistically evident regression of extent of ash damage on the air humidity was found out.

Klíčová slova: nekróza jasanu, *Hymenoscyphus pseudoalbidus*, *Chalara fraxinea*, epidemiologie, vlhkost vzduchu

Key words: ash dieback, *Hymenoscyphus pseudoalbidus*, *Chalara fraxinea*, epidemiology, air humidity

ÚVOD

V posledním desetiletí se v severovýchodní Evropě objevilo nebezpečné hromadné odumírání jasanů (tzv. nekróza jasanů), jehož původce – *Chalara fraxinea* T. Kowalski byl poprvé identifikován v r. 2001 (KOWALSKI 2001, 2006). Pozdější studie potvrdily náležitost tohoto hyfomycetu ke kryptickému druhu *Hymenoscyphus pseudoalbidus* Queloz, Grünig, Berndt, T. Kowalski, T. N. Sieber & Holdenr. (QUELOZ et al. 2011). Patogen se rychle rozšířil do dalších částí Evropy (EPPO 2007, 2008a, b, 2012) včetně České republiky, kde byl poprvé potvrzen r. 2007 a dnes se vykytuje víceméně na celém území státu (HAVRDOVÁ unpubl.; HAVRDOVÁ, ČERNÝ 2012; JANKOVSKÝ, HOLDENRIEDER 2009). Nebezpečnost patogenu a jeho rychlé šíření znepokojuje lesnické a další odborníky ve velké části Evropy. Obecně je pohled na další vývoj epidemie velmi skeptický a někteří autoři připouštějí i možnost kolapsu celých populací jasanu (např. MCKINNEY et al. 2011). Nekróza jasanu způsobuje problémy v celé řadě různých typů porostů a výsadeb. Nejvýraznější problémy lze očekávat ve výsadbách s vyšším zastoupením a významem jasanu, a to na vlhkých stanovištích v jasanovo-olšových luzích a v tvrdých luzích nížinných řek, obecně také v břehových porostech. Dopad choroby je už teď lokálně velmi výrazný i ve výsadbách ve volné krajině, kde je jasan často významnou složkou prvků ÚSES, a to nejen v břehových porostech, ale i stromořadích, remízích a další roztroušené výsadbě (HAVRDOVÁ, ČERNÝ 2012). Při podrobném průzkumu CHKO Lužické hory v r. 2012 byla přítomnost nekrózy jasanu potvrzena v 94% zkoumaných ploch a bylo zjištěno, že průměrná úroveň poškození porostů

byla 10,30% a objem uschlých korun jasanů činil po přepočtu více než 4100 m³ na 1 ha porostu (HAVRDOVÁ, ČERNÝ 2012). Vzhledem k tomu, že choroba byla poprvé v oblasti identifikována v r. 2009, je to z hlediska intenzity šíření patogenu a rozvoje choroby velmi zásadní informace.

Vzhledem ke značné ekologické valenci jasanu a jeho výskytu v nejrůznějších vegetačních stupních, společenstvech a na různých stanovištích lze ale předpokládat, že dopad choroby se může lišit v závislosti na typu výsadeb, porostů a společenstev a může být také závislý na různých faktorech prostředí. Z hlediska dlouhodobého hospodaření v krajině je důležité disponovat informacemi o invazibilitě různých typů porostů, jejich poškození a o významu nejdůležitějších faktorů prostředí v epidemiologii choroby (HAVRDOVÁ, ČERNÝ 2012).

Recentní výzkumy v CHKO Lužické hory potvrdily, že se poškození jednotlivých typů porostů mezi sebou statisticky průkazně liší – nejméně jsou napadeny solitérní jasanové porosty ve volné krajině a nejvíce břehové porosty a jasanové olšiny (HAVRDOVÁ, ČERNÝ 2012). Vzhledem k faktu, že nejvíce napadeny jsou porosty s předpokládanou vysokou vlhkostí vzduchu a vzhledem k obecně známé vazbě nejrůznějších houbových patogenů výhonů dřevin (např. *Apiognomonina* spp., *Glomerella cingulata*, *Venturia* spp. aj.) na vyšší vlhkost vzduchu (SINCLAIR, LYON 2005) lze předpokládat, že podobný vztah může existovat i u nekrózy jasanu způsobené *H. pseudoalbidus*. Tento článek seznamuje s předběžnými výsledky výzkumu zaměřeného na možný význam vlhkosti vzduchu v epidemiologii této choroby.

MATERIÁL A METODIKA

Modelové území, výběr výzkumných ploch

Pro výzkum bylo vybráno modelové území geomorfologicky i vegetačně velmi heterogenní CHKO Lužické hory, které je lokalizováno mezi 50° 46'–50° 55' s. š. a 14° 25'–14° 52' v. d. Na poměrně malé rozloze (264 km²) se značným výškovým gradientem (312–793 m n. m.) jsou zastoupeny různé typy porostů jasanu, které jsou již poměrně dlouhou dobu vystavené infekčnímu tlaku patogenu. Patogen se do oblasti rozšířil přibližně před 6 lety, dnes je rozšířen po celém území a jeho populace je relativně ustálená.

V území byly v r. 2011 vybrány čtyři menší oblasti o ploše cca 20 km², respektující vegetační a geomorfologickou variabilitu území. Každá oblast byla rozdělena na 20 čtverců o straně 1 × 1 km, v každém čtverci byla vybrána jedna výzkumná kruhová plocha (r = 50 m), celkem tak bylo sledováno 80 ploch. Při výběru ploch bylo respektováno pravidlo rovnoměrného zastoupení všech typů porostů ve všech čtyřech oblastech a v co možná nejširším výškovém gradientu. Podrobnější metodika a pravidla výběru jednotlivých ploch, viz HAVRDOVÁ, ČERNÝ (2012).

Při průzkumu v r. 2011 byl sledován rozsah procentuálního poškození korun jasanů na jednotlivých výzkumných plochách v pěti kategoriích porostů: (i) solitérní výsadba – solitérní jedinci ve venkovské krajině, (ii) roztroušená výsadba – skupiny a linie ve volné venkovské krajině (remízy, linie, stromořadí, okraje porostů), (iii) břehový porost – souvislé liniové břehové porosty ve volné krajině či v intravilánu obce, (iv) lesní výsadba – roztroušený až souvislý výskyt v lesních porostech (cesty, okraje porostů, drobné kotlíky) a v ochranných porostech a (v) jasanová olšina – původní či sekundární jasanovo-olšový luh či údolní jasanová olšina. Bližší informace k parametřům použitým k rozdělení porostů do jednotlivých kategorií jsou uvedeny v metodice HAVRDOVÁ, ČERNÝ (2012).

Průzkum vzdušné vlhkosti a teploty v r. 2012 byl z finančních důvodů proveden pouze na 50 plochách (z celkového počtu 80 sledovaných

ploch) – každý typ porostu byl tedy zastoupen 10 lokalitami (obr. 1, tab. 1). Plochy pro měření vlhkosti a teploty prostředí byly opět vybírány tak, aby pokryly co možná nejvíce variabilitu prostředí – nadmořskou výšku, expozici a sklon terénu a geomorfologii. Při výběru ploch byla rovněž respektována variabilita v úrovni poškození porostů.

Pro potřeby této publikace jsou ve výsledcích uváděny hodnoty poškození jasanu pouze z těch lokalit, na kterých byla rovněž měřena teplota a vzdušná vlhkost.

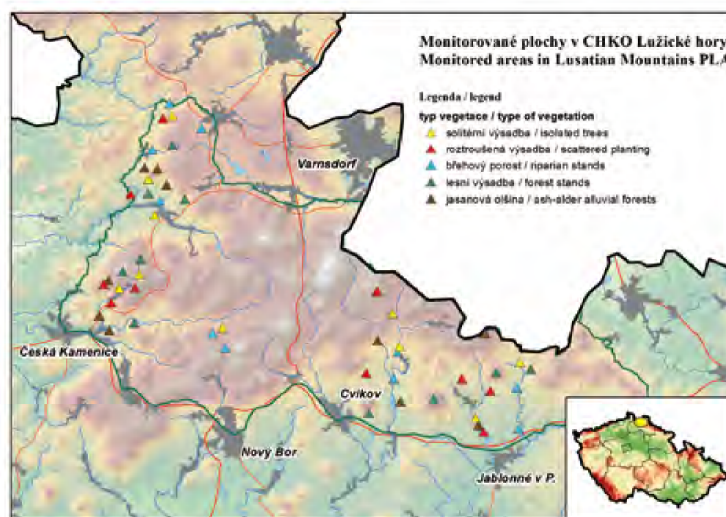
Měření vlhkosti vzduchu a sběr dat

Průzkum vzdušné vlhkosti a teploty v r. 2012 proveden na 50 plochách (obr. 1), vlhkost vzduchu a teplota byla měřena zařízeními typu Datalogger Minikin THI s vlastním zdrojem energie a s radiálním krytem chránícím před vlivem solárního záření (EMS Brno).

Vlastnímu měření vlhkosti a teploty na vybraných plochách předcházelo měření vývoje vlhkosti a teploty v profilu koruny hostitele. Cílem bylo identifikovat optimální výšku umístění dataloggerů v profilu porostu nad úroveň, kde by mohly být měřené hodnoty ovlivněny vyšší přízemní vlhkostí. Měření profilu proběhlo na 3 plochách (jasanová olšina, břehový porost a solitér) na konci května (9. 5.–1. 6. 2012) a jako nejnižší vhodná výška byla vyhodnocena výška 4,5 m od paty kmene. Datalogger byly na výzkumných plochách instalovány na začátku června co nejbližší jejich středu na severní stranu kmenů. Data byla měřena v období 15. 6.–31. 8. 2012 v intervalu 5 min. a byl zaznamenáván jejich průměr za 15 min. Po skončení měření byly hodnoty z dataloggerů odečteny pomocí čtecího zařízení společnosti EMS Brno a přeneseny pomocí IrDA kabelu do záznamového zařízení (notebooku).

Statistické vyhodnocení

Naměřená data vlhkosti vzduchu a teploty byla digitalizována a zpracována pomocí kompatibilního free software Mini32 dodavatelské společnosti měřicích zařízení EMS Brno a programu Microsoft Office



Obr. 1.
50 ploch na území CHKO Lužické hory, kde byla sledována vzdušná vlhkost
Fig. 1.
Research plots in the Lusatian Mountains Protected Landscape Area

Excel. Data byla následně vyhodnocena ve statistickém balíku Statistica 9.0 (Statsoft, Inc Tulsa, OK). Normální rozdělení dat neměly vyhodnocované proměnné vlhkost vzduchu a podíl poškození korun (u první proměnné byly hodnoty soustředěny nad 0,70 a u druhé pod 0,30), a proto byly hodnoty transformovány pomocí arcsinové transformace, jenž je v takových případech doporučována (např. HENDL 2006; LEPŠ 1996). Data byla zpracována pomocí regresní analýzy dat a ANOVY (Duncanův test).

VÝSLEDKY

Předchozí výzkum rozsahu poškození jasanů v CHKO Lužické hory patogenem *H. pseudoalbidus* ukázal, že se jednotlivé typy porostů průkazně liší úrovní poškození (HAVRDOVÁ, ČERNÝ 2012). Po dalším posouzení získaných dat se ukázalo, že se v úrovni napadení liší zejména typy porostů, u kterých lze očekávat výrazně odlišnou vlhkost prostředí (obr. 2, 3). V průměru nejmenší objemy poškození byly identifikovány v kategorii solitérní výsadba (2,33 %), kde byla zároveň zjištěna nejnižší průměrná vlhkost vzduchu (78,64 %). Naopak největ-

ší průměrné objemy poškození se vyskytovaly v břehových porostech (17,02 %) a jasanových olšinách (12,22 %), kde byly zároveň zjištěny velmi vysoké hodnoty vzdušné vlhkosti (82,49 %, resp. 84,66 %). Rozdíl ve vlhkosti vzduchu mezi nejsušším a nevlhčím typem porostu byl tedy 6,02 % (viz tab. 1, obr. 3). Analýza variance ukázala, že se stanoviště průkazně ve vlhkosti vzduchu liší ($p < 0,001$). Vzájemné porovnání (Duncanův test) ukázalo, že rozdílné napadené porosty se zároveň ve stejném schématu liší ve vlhkosti prostředí. Stanoviště průkazně více napadených porostů (břehové porosty a jasanové olšiny) mají tedy zároveň průkazně vyšší vzdušnou vlhkost než stanoviště méně napadených solitérních (a roztroušených) výsadeb, kde je vlhkost nižší.

Nejvyšší průměrná denní vlhkost (88,88 %) byla zaznamenána v jasanové olšině na ploše Naděje_Hamr, kde byl také zaznamenán nejvyšší podíl nekrózy v porostu (28,79 %). Nejnižší hodnoty denní vlhkosti (74,68 %) byly naměřeny v lesní výsadbě na ploše Drnovec_Zelený vrch, kde podíl nekrózy činil (5 %) a patří mezi nejmenší objemy poškození (tab. 1).

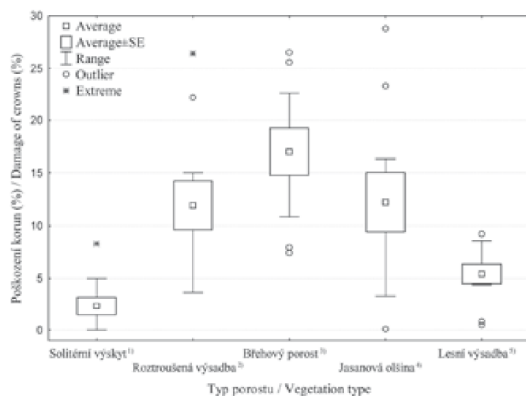
Výše uvedené výsledky jasně ukázaly, že zde může existovat přímá souvislost mezi vlhkostí prostředí a úrovní napadení jasanů. Proto

Tab. 1.

Průměrná průměrná vzdušná vlhkost a podíl nekrózy na ploše v různých typech porostu v CHKO Lužické hory
Average air humidity and rate of necrotised crowns in particular ash vegetation types in the Lusatian Mountains

Typ porostu/ Type of vegetation	Počet lokalit/ Number of plots (n)	Průměrná vlhkost/ Average humidity (%)			Poškození korun/ Crown damage (%)		
		Min.	Max.	Prům./Avg.	Min.	Max.	Prům./Avg.
Solitérní výsadba ¹	10	75,02	81,10	78,64	0,00	8,28	2,33
Roztroušená výsadba ²	10	76,02	83,08	78,98	3,65	26,40	11,93
Břehový porost ³	10	78,77	85,66	82,49	7,42	26,50	17,02
Lesní výsadba ⁴	10	74,68	87,87	81,39	0,48	9,22	5,42
Jasanová olšina ⁵	10	78,70	88,88	84,66	0,08	28,79	12,22

Captions: ¹Isolated trees; ²Scattered distribution; ³Riparian stand; ⁴Forest stand on slope; ⁵Mixed ash-alder alluvial forest



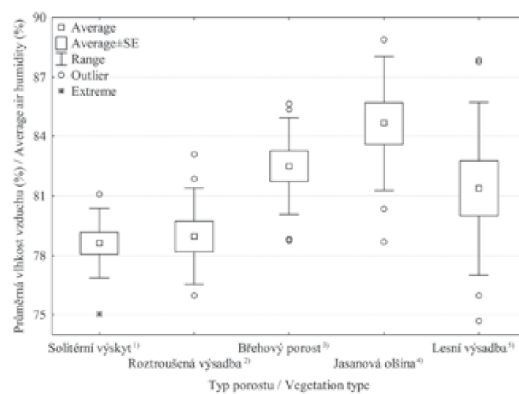
Obr. 2.

Procentuální poškození korun jasanu patogenem *H. pseudoalbidus* v různých typech porostu v CHKO Lužické hory

Fig. 2.

Extent of damage of ash crowns caused by *H. pseudoalbidus* in different vegetation types in the Lusatian Mountains

Captions: ¹Isolated tree; ²Scattered distribution; ³Riparian stand; ⁴Mixed ash-alder alluvial forest; ⁵Forest stand on slope



Obr. 3.

Průměrná vlhkost vzduchu v různých typech porostu v CHKO Lužické hory

Fig. 3.

Average air humidity in different vegetation types in the Lusatian Mountains

Captions: ¹Isolated tree; ²Scattered distribution; ³Riparian stand; ⁴Mixed ash-alder alluvial forest; ⁵Forest stand on slope

byla provedena regrese rozsahu poškození porostů na vlhkost prostředí. Analýza jasně ukázala (obr. 4), že rozsah poškození porostů je závislý na průměrné denní vlhkosti ($p < 0,01$; $r = 0,36$). Prezentované výsledky (obr. 2, 3, 4, tab. 1) ovšem ukazují značnou variabilitu v datech a zjištěná závislost je relativně slabá a lze tedy s vysokou pravděpodobností předpokládat, že v rozvoji choroby a jejím dopadu může hrát roli celá řada dalších faktorů.

Průběh průměrné denní vzdušné vlhkosti má u všech typů porostů stejný charakter. Během nočních a ranních hodin (22.00–7.00 hod.) dosahuje vlhkost vzduchu hodnot nejvyšších a po poledni (13.00–16.00 hod.) dosahuje hodnot nejnižších. Na vlhčích plochách se v nočních a ranních hodinách hodnoty vlhkosti přibližovaly 100% a během dne pak vlhkost klesala k 75%. Na sušších lokalitách se v ranních hodinách hodnoty pohybovaly okolo 96% a během dne pak klesaly na 62% (obr. 5).

Z prvních vyhodnocených výsledků vyplývá, že rozsah poškození jasanu patogenem *Hymenoscyphus pseudoalbidus* v CHKO Lužické hory je závislý na vzdušné vlhkosti.

DISKUSE

Patogen *H. pseudoalbidus* je na sledovaném modelovém území CHKO Lužické hory značně a dlouhodobě rozšířen. Poprvé byl v ČR zjištěn v r. 2007 (JANKOVSKÝ, HOLDENRIEDER 2009) a ve studovaném území CHKO Lužické hory v r. 2009 (ČERNÝ unpubl.). Patogen napadá v zájmovém území všechny typy porostů, úroveň poškození různých porostů se ovšem velmi liší (HAVRDOVÁ, ČERNÝ 2012). Napadení porostů je závislé na faktorech prostředí (BENOIT et al. 2012; HAVRDOVÁ, ČERNÝ 2012) – přinejmenším alespoň na typu porostu (stanovišti) a vlhkosti prostředí. Vlhkost prostředí pravděpodobně může ovlivňovat rozvoj poškození jasanů i podle zkušeností jiných výzkumníků z dalších zemí (např. CHIRA et al. 2012; NIELSEN et al. 2012).

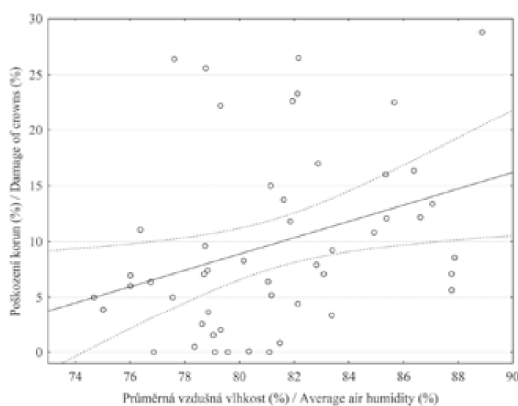
Vysoká variabilita poškození porostů v zájmovém území ovšem naznačuje roli dalších faktorů prostředí v epidemiologii choroby. Tyto faktory mohou přímo nebo nepřímo rovněž souviset s vlhkostí pro-

středí, např. s nadmořskou nebo relativní výškou. Vlhčími oblastmi jsou totiž obecně níže situované lokality, kde dochází k déletrvajícím kondenzačním prostředí (tj. k déletrvajícím 100% vlhkosti vzduchu) (KUČERA, osobní sdělení), což může mít za následek vyšší poškození jasanů.

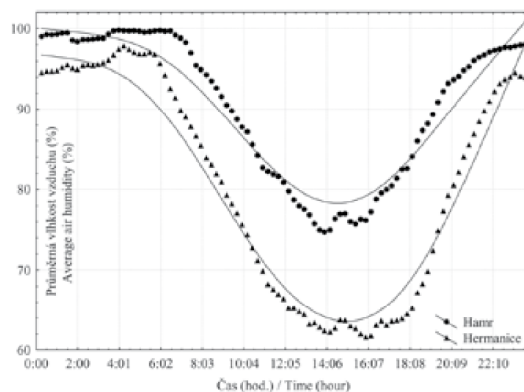
Značná variabilita v rozsahu poškození jasanů v krajině a pravděpodobná závislost na faktorech prostředí jsou i v souladu se zdánlivě rozporným názorem dánských kolegů (NIELSEN et al. 2012), podle kterých je poškození jasanů v krajině Dánska rovnoměrné. To ovšem může být jednoduše vysvětleno faktem, že v Dánsku je variabilita faktorů prostředí ve srovnání s Francií a modelovým územím CHKO Lužické hory naprosto minimální (malá nadmořská výška, homogenní geomorfologie, stabilní vysoká vlhkost prostředí – oceánské klima).

Patogen *H. pseudoalbidus* se šíří askosporami unášenými vzduchem od poloviny června do srpna (např. KOWALSKI, HOLDENRIEDER 2009; QUELOZ et al. 2011; TIMMERMANN et al. 2011). Vlhkost prostředí má pro šíření a rozvoj choroby pravděpodobně význam tedy jen během inkriminovaných měsíců, kdy se patogen šíří (významný vliv má zřejmě vlhkost prostředí při klíčení askospor na listech hostitele), a i tehdy nejspíš jen během relativně krátkého časového úseku. Askospory se totiž šíří především v ranních hodinách mezi 6.00–8.00 hod., nejvíce pak okolo 7. hodiny (TIMMERMANN et al. 2011). Naše měření ukázalo, že tímto zjištěním může velmi dobře odpovídat průběh denní vlhkosti. Během nočních a ranních hodin je vlhkost v prostředí nejvyšší – téměř 100% – a teprve okolo 7. hodiny ranní se začíná snižovat, což může souviset s východem slunce (obr. 5). Po deváté hodině, kdy se askospory již téměř nešíří (TIMMERMANN et al. 2011), je vlhkost vzduchu o cca 10% nižší. Zdá se tedy, že vlhčí prostředí stimuluje dozrávání a šíření askospor a zároveň zvyšuje úspěšnost jejich klíčení. Tyto rozdíly v průběhu denní vlhkosti na sušších a vlhčích stanovištích (obr. 5) tak mohou nakonec přímo souviset s rozsahem poškození porostů.

Nelze také vyloučit, že průběh ročních srážek a jejich variabilita mohou ovlivnit množství inokula, a tedy rozvoj a rozsah poškození jasa-



Obr. 4. Závislost poškození korun jasanu patogenem *H. pseudoalbidus* na průměrné vlhkosti vzduchu
Fig. 4. Regression of extent of damage caused by *H. pseudoalbidus* on average air humidity



Obr. 5. Denní průběh vlhkosti vzduchu za období 20. 6.–20. 7. 2012 na vlhčím (Naděje_Hamr – jasanová olšina) a sušším stanovišti (Heřmanice – solitérní výsadba)
Fig. 5. Diurnal course of air humidity between 20th June and 20th July 2012 in humid (Naděje_Hamr – mixed ash-alder alluvial forest) and drier stands (Heřmanice – isolated trees)

nů (defoliaci a následně i prosychání) během roku. Následně by tak mohlo být ovlivněno množství inokula v další sezóně. Na některých modelových plochách v Lužických horách došlo například v r. 2012 ke zlepšení zdravotního stavu jasanů, a to právě pravděpodobně vzhledem k teplejšímu a suššímu průběhu začátku léta. Zlepšení zdravotního stavu jasanů sledovali na některých lokalitách i v Dánsku (THOMSEN, osobní sdělení).

ZÁVĚR

Na základě naměřených dat získaných z 50 ploch reprezentujících všechny typy jasanových porostů rovnoměrně rozložených na modelovém území CHKO Lužické hory lze jednoznačně říci, že vlhkost vzduchu průkazně ovlivňuje intenzitu napadení jasanu patogenem *Hymenoscyphus pseudoalbidus*. Nejnižší vlhkost vzduchu byla naměřena u solitérní výsadby (78,64 %), kde zároveň docházelo k nejmenšímu průměrnému poškození korun jasanů (2,33 %). Nejvyšší hodnoty vlhkosti byly identifikovány v jasanových olšinách (84,66 %) a břehových porostech (82,49 %), kde také docházelo k nejvyššímu poškození korun jasanů (12,22 a 17,02 %). Průkazné rozdíly ve vzdušné vlhkosti prostředí různých typů porostů potvrdila analýza variance ($p < 0,001$). Porosty lišící se vlhkostí vzduchu se zároveň ve stejném schématu lišily v podílu poškození korun (viz HAVRDOVÁ, ČERNÝ 2012). Závislost rozsahu poškození na vlhkosti vzduchu pak byla potvrzena regresní analýzou ($p < 0,01$).

Nejvyšší vlhkost vzduchu byla naměřena v noci, mezi 22.00 až 7. hodinou ránní a nejnižší hodnoty pak mezi 13.–16. hodinou odpolední. K největšímu šíření askospor pravděpodobně dochází před snižováním vlhkosti vzduchu a zvyšováním teploty, tedy v časných ranních hodinách.

Práce na projektu budou nadále pokračovat. V následujícím období bude vliv vlhkosti detailně zkoumán a bude ověřován případný vliv dalších faktorů prostředí na rozsah napadení porostů.

Poděkování:

Práce byla podpořena projekty Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy č. ČZU IGAFLD20124354, ČZU CIGA20124309 a Ministerstva zemědělství České republiky č. NAZV QI92A207. Dále bychom chtěli poděkovat ing. Jiřímu Kučerovi (EMS Brno) a Dr. Janu Pivcovi (ČZU FAPPZ KAB) za cenné rady a konzultace a ing. Alexandru Hrozkovi (SCHKO Lužické hory) a ing. Petrovi Zábranskému (ČZU FAPPZ KAB) za pomoc při instalaci dataloggerů.

LITERATURA

BENOIT M., HUSSON C., LEMONNIER S. AND DOWKIW A. 2012. Situation with Ash in France. COST ACTION FP1103 FRAXBAC 1st MC/WG Meeting, November 13-14th 2012 Radisson Blu Hotel, Vilnius, Lithuania.

ČERNÝ K. unpubl. Obnova a dlouhodobý přírodě blízký management břehových porostů vodních toků. Projekt MZe NAZV QI92A207, 2009–2013.

CHIRA D., NICOLESCU V. N., ALDEA D., POPOVICI O. 2012. Situation with ash in Romania. Stand characteristics, health condition, ongoing work and research needs. In: COST ACTION FP1103 FRAXBAC 1st MC/WG Meeting, November 13-14th 2012 Radisson Blu Hotel, Vilnius, Lithuania: 33.

EPPO. 2007. Ash dieback in Europe and possible implication of *Chalara fraxinea*. Addition to the EPPO Alert List. EPPO Reporting Service, 2007/179. European and Mediterranean Plant Protection Organization: 8–9.

EPPO. 2008a. First report of *Chalara fraxinea* in Norway. EPPO Reporting Service, 2008/181. European and Mediterranean Plant Protection Organization: 7.

EPPO. 2008b. First report of *Chalara fraxinea* in Finland. EPPO Reporting Service, 2008/182. European and Mediterranean Plant Protection Organization: 7–8.

EPPO. 2012. *Chalara fraxinea*, Ash dieback. [online]. EPPO Reporting Service. European and Mediterranean Plant Protection Organization [cit. 6. prosince 2012]. Dostupné na World Wide Web: http://epo.int./QUARANTINE/Alert_List/fungi/Chalara_fraxinea.htm.

HAVRDOVÁ L. unpubl. Vývoj efektivních opatření eliminujících dopad invaze *Chalara fraxinea* v lesním školkařství a v navazujících aspektech lesního a vodního hospodářství. Projekt MZe NAZV KUS QJ1220218, 2012–2016.

HAVRDOVÁ L., ČERNÝ K. 2012. Invaze *Chalara fraxinea* v CHKO Lužické hory – předběžné výsledky výzkumu. Acta Pruhoniciana, 100: 137–145.

HENDI J. 2006. Přehled statistických metod zpracování dat. Praha, Portál: 583 s.

JANKOVSKÝ L., HOLDENRIEDER O. 2009. *Chalara fraxinea* – Ash dieback in the Czech Republic. Plant Protection Science, 45: 74–78.

KOWALSKI T. 2001. O zamieraniu jesionów [About ash dieback]. Trybuna Leśnika, 4: 6–7.

KOWALSKI T. 2006. *Chalara fraxinea* sp. nov. associated with dieback of ash (*Fraxinus excelsior*) in Poland. Forest Pathology, 36: 264–270.

KOWALSKI T., HOLDENRIEDER O. 2009. The teleomorph of *Chalara fraxinea*, the causal agent of ash dieback. Forest Pathology, 39: 304–308.

LEPŠ J. 1996. Biostatistika. České Budějovice, Jihočeská univerzita České Budějovice: 166 s.

McKINNEY L.V., NIELSEN L.R., HANSEN J.K., KJÆR E.D. 2011. Presence of natural genetic resistance in *Fraxinus excelsior* (*Oleraceae*) to *Chalara fraxinea* (*Ascomycota*): an emerging infectious disease. Heredity, 106: 788–797.

NIELSEN L. R., McKINNEY L. V., THOMSEN I. M., OLRIK D. C., KJÆR E. D. 2012. Ash in Denmark anno 2012. In: COST ACTION FP1103 FRAXBAC 1st MC/WG Meeting, November 13-14th 2012 Radisson Blu Hotel, Vilnius, Lithuania: 16–17.

QUELOZ V., GRÜNIG C. R., BERNDT R., KOWALSKI T., SIEBER T. N., HOLDENRIEDER O. 2011. Cryptic speciation in *Hymenoscyphus albidus*. Forest Pathology, 41: 133–142.

SINCLAIR W.A., LYON H.H. 2005. Diseases of trees and shrubs. Ithaca, Cornell University Press: 660 s.

TIMMERMANN V., BØRJA I., HIETALA A.M., KIRISITS T., SOLHEIM H. 2011. Ash dieback: pathogen spread and diurnal patterns of ascospore dispersal, with special emphasis to Norway. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 41: 14–20.

THE IMPORTANCE OF AIR HUMIDITY IN ASH DIEBACK EPIDEMIOLOGY - PRELIMINARY RESULTS

SUMMARY

The aim of the article is the investigation of potential importance of air humidity in ash dieback epidemiology caused by the alien invasive pathogen *Hymenoscyphus pseudoalbidus*. The investigation linked up to the previous investigation of the disease impact in different types of ash vegetation in the Lusatian Mountains Protected Landscape Area, Czech Republic (Fig. 2; HAVRDOVÁ, ČERNÝ 2012). The sensors Datalogger Minikin THi (EMS Brno) measuring the air humidity were installed in 50 selected permanent circular plots ($r = 50$ m) respecting the diversity of ash stands in the area (Fig. 1). The disease impact (the rate of ash crowns necrotised by *H. pseudoalbidus*) was also measured. The air humidity was measured 4.5 m above ground level in centres of research plots. The data were recorded in 15 min intervals during June and August (the main period of ascospore spread) in 2012. All data were arcsin transformed and processed using Statistica 9.0 (Statsoft, Inc Tulsa, OK).

It was found out that the investigated vegetation types importantly differed according to the disease impact and air humidity (Figs. 2, 3, 4; Tab. 1). The most affected were riparian stands (average damage was 17.02%) and mixed ash-alder alluvial stands (avg. damage reached 12.22%). The scattered ash trees were the less affected vegetation type (2.33%). It was found out that the average air humidity statistically differed among particular vegetation types which corresponded to the disease impact. The highest level of air humidity was identified in vegetation types with highest disease impact – in riparian stands (82.49%) and in ash-alder mixed alluvial forests (84.66%). The lowest air humidity was found out in isolated trees in open landscape (78.64%; Fig. 3), which were concurrently damaged to the least extent. Moreover, the statistically evident regression of extent of ash damage on the air humidity ($r = 0.36$; $p = 0.01$; Fig. 5) was identified. The diurnal course of the air humidity was following: average air humidity reached nearly 100% during night (from ca 10.00 p.m. to 7.00 a.m.), then it sharply decreased to the minimum of ca. 60–75% (according to the type of vegetation), which persisted between 1.00 and 4.00 p.m. The humidity increased gradually in the evening. Ascospores likely discharge and their dissemination occur at the end of the maximum humidity period. When the air humidity decreases the ascospores dissemination stops. The investigation is ongoing. Further research will be focused on investigation of influence of air humidity and other environmental factors potentially affecting the disease impact.

Recenzováno

ADRESA AUTORA/CORRESPONDING AUTHOR:

Ing. Ludmila Havrdová, Česká zemědělská univerzita v Praze, Fakulta lesnická a dřevařská
Kamýčká 129, 165 21 Praha 6 - Suchbátka, Česká republika
tel. + 420 296 528 235; e-mail: havrdova@vukoz.cz

5.3. Nekróza jasanu v břehových porostech

Extrémní rozvoj nekrózy jasanu v břehových porostech je podmíněn vysokou vlhkostí jejich prostředí

Ludmila Havrdová, Petr Zábranský, Karel Černý

2014

Vodní hospodářství 11/2014: 25–28

Publikováno

Extrémní rozvoj nekrózy jasanu v břehových porostech je podmíněn vysokou vlhkostí jejich prostředí

Ludmila Havrdová, Petr Zábranský, Karel Černý

Abstrakt

Hymenoscyphus pseudoalbidus (*Chalara fraxinea*) je invazní houbový patogen, který v posledních letech způsobuje intenzivní chřadnutí jasanu ztepilého a j. úzkolistého. Výzkum prováděný od r. 2011 v modelovém území CIKO Lužické hory sleduje dopad choroby v různých typech porostu jasanu a hledá faktory prostředí, které ovlivňují rozsah poškození těchto dřevin. V r. 2012 byla v záměrném území na 50 trvalých výzkumných plochách respektujících maximální diverzitu porostů a stanovišť s jasanem instalována měřicí zařízení Datalogger Minikin THi (EMS Brno) měřící vlhkost vzduchu. Vlhkost vzduchu byla měřena 4,5 m nad zemí ve středu výzkumných ploch. Data byla snímána v intervalu 15 min. v průběhu července a srpna, kdy dochází k šíření askospor patogenu. Na sledovaných plochách byl měřen převládající sklon terénu pomocí sklonoměru. Naměřená data byla porovnána s poškozením jasanu na výzkumných plochách. Bylo zjištěno, že největší průměrné objemy poškození se vyskytovaly v břehových porostech a jasanových olšinách, tedy u těch porostů, kde lze očekávat výrazně vyšší vlhkost prostředí a menší sklon terénu. Nejmenší vzdušná vlhkost a největší sklon terénu byl naměřen u soliterních výsadeb, které jsou zároveň nejméně poškozeným typem vegetace. Břehové porosty (a také údolní luhy a lužní porosty) lze jednoznačně označit jako porosty nejvíce ohrožené invazí *H. pseudoalbidus*.

Klíčová slova

nekróza jasanu – *Hymenoscyphus pseudoalbidus* – *Chalara fraxinea* – břehové porosty – *Fraxinus excelsior*

Úvod

Jasan ztepilý je jednou z klíčových dřevin břehových porostů v ČR a po epidemii grafiozy jilmů, kdy poklesla četnost populace našich jilmů na cca 5–10 %, a poté, co se na území ČR rozšířila plíseň olšová a začala decimovat porosty olše lepkavé a olše šedé [1, 2], význam jasanu ztepilého výrazně narostl. Situace se ovšem zásadně změnila v posledních cca 5 letech, kdy se i jasan stal středem pozornosti fytopatologů a jeho předpokládané použití nejen jako náhradní dřeviny musí být zásadně revidováno.

Jasan ztepilý (*Fraxinus excelsior*) byl dlouhou dobu z hlediska zdravotního stavu a výskytu možných patogenů v ČR sledován jako relativně bezproblémová dřevina. Mezi významnější patogeny a škůdce jasanu bylo možno zařadit např. fytoftory (*Phytophthora* spp.), verticilia (*Verticillium* spp.), padlí jasanové (*Pyllostictia fraxini*), rázovku (*Noctria galligena*), pseudomonádu (*Pseudomonas savastanoi* pv. *fraxini*), rezavce štětinatého (*Inonotus hispidus*), lýkohuba jasanového (*Leprosinus fraxini*) a zrnitého (*Ilysius crenatus*) či dutilku jasanovou (*Prociplus buneliac*) a některé další organismy [3]. V polovině 90. let 20. století se ovšem objevilo intenzivní chřadnutí jasanů způsobené do té doby neznámým patogenem *Chalara fraxinea* [4], postupně se rozšířilo i na území ČR a jasan se zařadil po bok dalších našich dřevin, jejichž populace jsou významně redukovány nepůvodními patogeny houbové povahy.

Nebezpečné hromadné odumírání jasanů (tzv. nekróza jasanu) se objevilo v severovýchodní Evropě a jeho původce hyfomycet *Chalara fraxinea* T. Kowalski byl poprvé identifikován v Polsku v r. 2001 a vědecky popsán v r. 2006 [5]. Pozdější studie potvrdily příslušnost tohoto druhu k nově popsanému askomycetu *Hymenoscyphus pseudoalbidus* V. Queloz, C. R. Grümig, R. Berndt, T. Kowalski, T. N. Sieber & O. Holdenrieder (*Helotiales, Leotiomyces, Ascomycota*), který se

v Evropě vyskytuje už nejméně od konce 70. let minulého století a je blíže příbuzný dřívě u nás hojnému druhu *H. albidus* [6]. V r. 2012 se ukázalo, že je *H. pseudoalbidus* identický se saprofytickým druhem *Lambertella albida*, který se běžně vyskytuje v Japonsku na opadu *Fraxinus mandshurica* [7]. Tím byla potvrzena domněnka, že patogen byl do Evropy zavlečen z Asie.

V současné době se patogen rozšířil do velké části Evropy, vlna epidemie se pohybuje od severovýchodu, především na jihozápad Evropy, na sever, jih a východ méně. Ze studia herbářových dokladů (Národní muzeum) vyplývá, že se patogen v ČR vyskytuje nejméně od roku 2002, nicméně velmi pravděpodobně se zde vyskytoval už od konce 90. let, kdy byly pozorovány první chřadnoucí porosty jasanů. Přítomnost patogenu byla delší dobu přehlížena patrně proto, že jasan není jako dřevina příliš ceněn a mnohdy není určen k hospodářskému pěstování a často se spíše používá jako meliorační a zpevňovací dřevina.

V současné době se patogen vyskytuje víceméně hojně na celém území státu. Vůči tomuto patogenu jsou oba naše původní druhy jasanů *Fraxinus excelsior* i *F. angustifolia* vysoce citlivé.

Jasan ztepilý (*Fraxinus excelsior* L.) se běžně vyskytuje ve velké části Evropy, je naší hojnou domácí dřevinou rozšířenou roztroušeně od nížin do horských poloh celého území v lužních lesích, pobřežních křovinách, suťových a roklinových lesích [8]. Na území ČR jsou zastoupené tři ekotypy jasanu ztepilého [9]. Lužní jasan provází nejčastěji dub letní a jilmu v zaplavovaných lužích podél větších řek. Horský jasan je zastoupen v oblasti buku tam, kde jsou příznivé vlhkostní a půdní poměry, tj. zejména podél potoků s olšemi a na suťových prameništích ve stráních, často spolu s klenem a jilmem horským a vystupuje až do výše 1000 m n. m. Vápencový jasan provází na bazických horninách často dub zimní, ale objevuje se v porostech s bukem, břečkem i v lesostepních společenstvech s šípákem [9].

Jasan úzkolistý (*Fraxinus angustifolia* Vahl) je dřevina jihoevropského rozšíření, zastoupená ve všech krajinách kolem Středozemního moře. Z Panonské nížiny vybíhá areál do nejteplejších částí Slovenska a jižní Moravy – roste jen v lužních lesích Dolnomoravského a Dyjskovsrateckého úvalu, nejseverněji zasahuje k Olomouci. Jeho rozšíření je velmi mezernaté a sestává v pástí lužních lesů – podél vodních toků v nížinách. Ekologické nároky jasanu úzkolistého jsou podobné nárokům lužního ekotypu jasanu ztepilého [9]. V rámci ČR je jasan úzkolistý méně významný než jasan ztepilý.



Obr. 1. Nekrotizace listů a řapíků jasanu

Epidemiologie a symptomy onemocnění

Patogen se ve formě askospor pohlavního stádia (*H. pseudoalbidus*) šíří větrem a primárně napadá listy jasanu a jejich řapíky. Po dopadu na čepele a řapíky listů jasanů spory klíčí, hyfy proniká do buněk listu, mycelium postupně kolonizuje list a dochází k jeho nekrotizaci (obr. 1). V důsledku napadení následuje opad napadených listů a někdy až značné odlíštění [10], což je obranná reakce hostitele (jasanu) na napadení patogenem (*Ch. fraxinea*, nepohlavní stádium). Mycelium může prorůstat pletivem řapíku dál přes listové stopy (cévní svazky vstupující ze stonků do listů) do výhonů a větví, kde patogen způsobuje rozsáhlé černavé až hnědavé nekrózy, které se rychle prodlužují oběma směry, přičemž části výhonů a větví nad poškozením mohou usychat (obr. 2). Kromě toho může patogen pravděpodobně pronikat do výhonů i pupeny, lenticelami, poraněními či v místech posátí lmyzem. Mycelium patogenu v pletivech hostitele (výhoncích, větvích) může přežít zimu, dále se šířit a poškození dřeviny postupně narůstá. Hostitel nejspíš může v některých případech oddělit napadenou část pletiv kalusem (hojivě pletivo) a infekci zastavit. Na řapících opadáných listů patogen přežívá a další vegetační sezónou se na odumřelých řapících vytvářejí mističkovité plodničky pohlavního stádia (apotecia). Apotecia, jak zjistil norskó-rakouský vědecký tým [11], se objevují od června do září (října) s největším výskytem v létě (červenec až srpen) a produkují velké množství askospor, které jsou unášeny větrem, kolonizují další listy a cyklus se opakuje.

Patogenem jsou napadány stromy všech věkových kategorií na různých typech stanovišť – od přirozených lesů po komerční lesní výsadby a výsadby okrasné [12, 13]. Rychleji a ve větším rozsahu jsou nektrózu jasanu postihovány sazenice a mladé výsadby (mladé stromky mohou v důsledku nektrózy odumřít i během jedné vegetační sezóny) než výsadby plně vzrostlé [14]. U vzrostlých jedinců se choroba v léto fází napadení projevuje odumíráním výhonů (zpravidla přírůstkem posledního roku) a postupným řídnutím koruny. Během jedné sezóny může dojít k napadení velkého množství výhonů a koruna dřeviny tak výrazně prosychá od obvodu (obr. 3). Dále dochází k odumírání drobných a později i kosterních větví a k rozsáhlému poškození. Strom na rozvoj patogenu reaguje tvorbou výhonů (víků), které vyrůstají pod odumřelými částmi větví, a vzniká typické shlukovitě olistění. Poškození může dosahovat až 80–90 % objemu koruny. Takto poškozené stromy samozřejmě neplní většinu svých funkcí a nakonec odumírají [15, 16, 17].

Protože je jasan jednou z klíčových dřevin břehových porostů, je velmi důležité zjistit, nakolik se patogen *Hymenoscyphus pseudoalbidus* může objevovat v břehových porostech a jaké tam může v porovnání s ostatními výsadbami s jasanem způsobovat škody (obr. 4). Proto byl v uplynulých letech proveden výzkum, který porovnával napadení jasanů v břehových porostech s dalšími typy výsadeb a porostů a pokoušel se identifikovat faktory prostředí, které mohou být za případné rozdíly zodpovědné.

Metodika

Pro výzkum bylo vybráno modelové území geomorfologicky i vegetačně velmi heterogenní CHKO Lužické hory, které má na poměrně malé rozloze (264 km²) značný výškový gradient (312–793 m n. m.) a jsou zde zastoupeny různé typy porostů jasanu, které jsou již poměrně dlouhou dobu vystavené infekčnímu tlaku patogenu. Patogen se do oblasti rozšířil přibližně před 6 lety a dnes je rozšířen po celém území a jeho populace je relativně ustálená.

Výzkum poškození jednotlivých typů porostů a jeho vazba na vybrané faktory prostředí byl proveden v letech 2011 a 2012. Při výběru ploch byla na zkoumaném území především respektována vegetační a geomorfologická variabilita území, pravidlo rovnoměrného zastoupení všech typů porostů a jejich rozložení v co možná nejširším výškovém gradientu. Bylo vybráno 50 kruhových výzkumných ploch (r = 50 m) ve čtyřech oblastech CHKO (podrobnější metodika a pravidla výběru jednotlivých ploch viz [14], které byly zařazeny do pěti kategorií porostů. Kategorie byly voleny tak, aby maximálně zohlednily heterogenitu výsadeb a porostů jasanu v oblasti a zároveň byly vylišeny zvlášť břehové porosty a jasanové olšiny jako hlavní předmět zájmu: (i) solitérní výsadba – solitérní jedinci ve venkovské krajině, (ii) roztroušená výsadba – skupiny a linie ve volné venkovské krajině (reintýz, linie, stromořadí, okraje porostů), (iii) břehový porost – souvislé liniové břehové porosty ve volné krajině či v intravilánu obce, (iv) lesní výsadba – roztroušený až souvislý výskyt v lesních porostech (cesty, okraje porostů, drobné kotlíky) a v odumřelých porostech a (v) jasanová olšina – původní či sekundární jasanovo-olšový luh či údolní



Obr. 2. Nekróza výhonu jasanu



Obr. 3. Odumírání výhonů a výrazné proschnutí koruny jasanu



Obr. 4. Břehový porost jasanu ztepilého odumírající v důsledku napadení *Hymenoscyphus pseudoalbidus*

Tab. 1. Podíl nekrózy na ploše, procentuální průměrná vzdušná vlhkost a sklon terénu v různých typech porostu v CHKO Lužické hory

Typ porostu	Počet lokalit (n)	Poškození korun (%)			Průměrná vlhkost (%)			Sklon terénu (stupně)		
		Min.	Max.	Prům.	Min.	Max.	Prům.	Min.	Max.	Prům.
Soliterní výsadba	10	0,00	8,28	2,33	75,02	81,10	78,64	3,00	14,00	8,60
Roztroušená výsadba	10	3,65	26,40	11,93	76,02	83,08	78,98	5,00	28,00	12,30
Břehový porost	10	7,42	26,50	17,02	78,77	85,66	82,49	1,00	12,00	4,90
Lesní výsadba	10	0,48	9,22	5,42	74,68	87,87	81,39	4,00	34,00	17,30
Jasanová olšina	10	0,08	28,79	12,22	78,70	88,88	84,66	1,00	18,00	7,00

jasanová olšina. Bližší informace k parametrům použitým k rozdělení porostů do jednotlivých kategorií jsou uvedeny v metodice viz [14]. Jako dva faktory výrazněji odlišující břehové porosty a jasanové olšiny od ostatních typů porostů byly vybrány vlhkost prostředí a sklon terénu. Na výzkumných plochách byly nainstalovány datalogery Mimikim TTI (TMS Brno) měřící vlhkost vzduchu prostředí (datalogery byly instalovány 4,5 m vysoko na severní straně kmenu jasanu ve středu výzkumné plochy). Bližší informace k metodice měření vlhkosti vzduchu viz [18].

Výsledky

Výzkum sledující rozsah poškození jasanů v břehových a dalších porostech v CHKO Lužické hory patogenem *H. pseudoalbidus* v r. 2011 ukázal, že se jednotlivé typy porostů průkazně liší úrovní poškození korun [14]. Dále se ukázalo, že se v úrovni napadení liší zejména ty porosty, u kterých lze očekávat výrazně odlišnou vlhkost prostředí a sklon terénu, viz tab. 1. V průměru nejmenší objemy poškození byly identifikovány v kategorii soliterní výsadba (2,33 %), kde byla zároveň zjištěna nejnižší průměrná vlhkost vzduchu (78,64 %). Naopak největší průměrné objemy poškození se vyskytovaly v břehových porostech (17,02 %) a jasanových olšinách (12,22 %), kde byly zároveň zjištěny velmi vysoké hodnoty vzdušné vlhkosti (82,49 %, resp. 84,66 %). Analýza variance ukázala, že se stanoviště průkazně ve vlhkosti vzduchu liší ($p < 0,001$). Vzájemné porovnání (Duncanův test) ukázalo, že rozdílně napadené porosty se zároveň ve stejném schématu liší ve vlhkosti prostředí. Stanoviště průkazně více napadených porostů (břehové porosty a jasanové olšiny) mají tedy zároveň průkazně vyšší vzdušnou vlhkost než stanoviště méně napadených soliterních (a roztroušených) výsadeb, kde je vlhkost nižší. Dle výše uvedených výsledků je zřejmé, že zde může existovat přímá souvislost mezi vlhkostí prostředí a úrovní napadení jasanů. Proto byla provedena regrese rozsahu poškození porostů na vlhkost prostředí. Tato analýza jasně ukázala, že rozsah poškození porostů je závislý na průměrné denní vlhkosti ($p < 0,01$; $r = 0,36$; graf 1).

V případě sklonu terénu byla prokázána rovněž významná variabilita mezi typy stanovišť a souvislost s úrovní napadení porostů. Nejmenší průměrný sklon terénu byl zjištěn u břehového porostu (4,90 %) a jasanových olšin (7,00 %), naopak největší průměrný sklon terénu byl potvrzen u lesní výsadby (17,30 %) a roztroušené výsadby

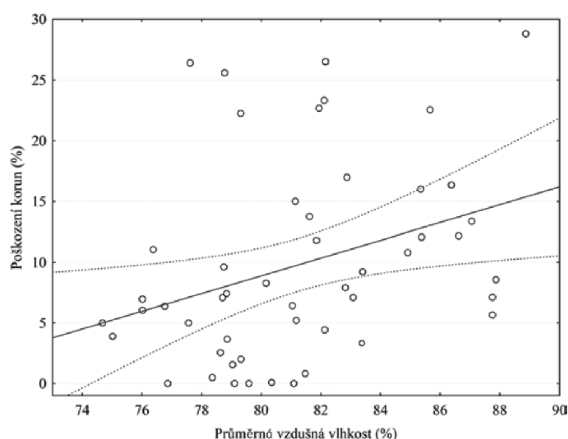
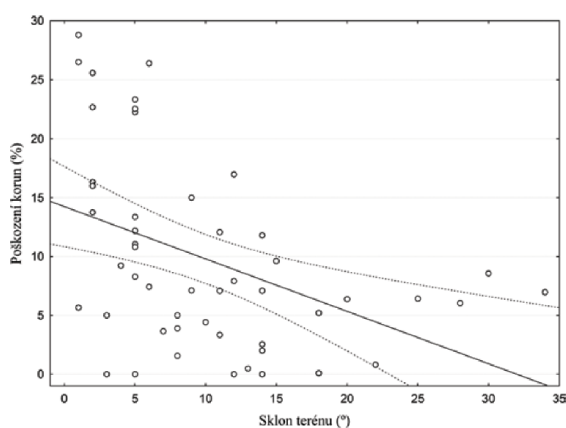
(12,30 %). Rozsah poškození porostů je rovněž závislý na sklonu terénu (regresní analýza $r = -0,43$; $p < 0,002$; graf 2).

Diskuse

Zastoupení jasanu ztepilého je z fyto geografického hlediska v ČR velmi různorodé – v některých oblastech státní je velmi hojný, jinde téměř chybí. To se projevuje i ve složení břehových porostů – např. v povodí Vltavy jasan tvoří v břehových porostech jen několik procent dřevin [23], v povodí Labe naopak jasan představuje až 30 % (Dolhal, Povodí Labe, státní podnik, osobní sdělení), i tam se zastoupení jasanů samozřejmě liší v rámci konkrétních břehových porostů. Přestože nekróza jasanu v povodí Vltavy poškozuje jasanů stejně jako v jiných oblastech, nepředstavuje vzhledem k relativně malému zastoupení jasanů v břehových porostech zásadní a obecně rozšířený problém. Naopak v povodí Labe je (na rozdíl od povodí Vltavy) současný dopad nekrózy jasanu podstatně vyšší než vliv plísňové olšové [21, 22].

Bylo zjištěno, že se břehové porosty a jasanové olšiny liší průkazně vyšší úrovní napadení patogenem *Hymenoscyphus pseudoalbidus* od jiných porostů a výsadeb jasanu (soliterní výsadby, roztroušená zeleň v krajině, lesní porosty). Typy porostů (stanovišť) se liší zároveň některými charakteristikami prostředí, které průkazně souvisejí s úrovní napadení – jedná se zejména o vlhkost prostředí a sklon terénu (resp. geomorfologii). Zjištěná fakta lze jednoznačně interpretovat tak, že porosty s jasanem, které rostou na stanovištích s vysokou vzdušnou vlhkostí a v málo exponovaných (rovinatých) polohách, jsou zároveň výrazně více napadeny patogenem. Zejména břehové porosty (a také údolní luhy a lužní porosty) lze jednoznačně označit jako porosty nejvíce ohrožené invazí *H. pseudoalbidus*.

Detekovaná vazba intenzity choroby na vyšší vlhkost prostředí je zcela očekávaná, protože plodničky pohlavního stádia se vytvářejí v opadu a pro jejich vytvoření je pravděpodobně zapotřebí vyšší vzdušná vlhkost. Askospory – infekční inokulumu patogene jsou hyalinní a tenkostěnné [17] a jako takové pravděpodobně velmi citlivé vůči vyschnutí, mimoto k šíření askospor a vzniku infekce dochází v časných ranních a dopoledních hodinách [11], kdy je vlhkost vzduchu nejvyšší [18]. Vysoká vzdušná vlhkost je tedy pravděpodobně podmínkou pro úspěšné proběhnutí infekčního procesu. V suchých letech může být infekční tlak nižší nebo se nástup epidemie může opozdit – což je nejspíše případ roku 2013, kdy vlna infekce proběhla

Graf 1. Procentuální poškození jasanu patogenem *Hymenoscyphus pseudoalbidus* v závislosti na vzdušné vlhkostiGraf 2. Procentuální poškození jasanu patogenem *Hymenoscyphus pseudoalbidus* v závislosti na sklonu terénu

na mnohých místech později než obvykle a opad listů napadených dřevin se jeví jako nižší než v minulých letech (Havrdová, nepublikováno). Podobnou vazbu šíření choroby a dopadu infekce na vlhkost prostředí a srážky můžeme identifikovat u řady houbových chorob asimilačního aparátu a výhonů nejrůznějších dřevin – např. u nejrůznějších listových skvrnitostí způsobených druhy r. *Apiognomonia*, *Mycosphaerella*, *Kabatella* aj. na různých listnácích, usychání výhonů topolů a vrb (*Venturia* spp., *Glomerella cingulata*) a dalších dřevin nebo u sypavek (způsobovaných např. druhy rodů *Mycosphaerella*, *Lophodermium*, *Rhizosphaera*) na jehličnanech [3, 19].

Velmi významný dopad (vedle hospodaření v lužních porostech a údolních luzích) má tedy nekroza jasanu v břehových porostech. Situace je umocněna tím, že jasan byl často používán jako náhradní dřevina za jilmu, které odumřely v důsledku epidemie grafiozy (jilm horský, j. vaz a j. habrolistý), a za olše (o. lepkavá, o. šedá), jejichž porosty jsou zejména v západní polovině státu decimovány plísní olšovou [1, 20, 21]. Vzhledem k současné situaci je nyní doporučováno podíl jasanu zepilého ve vybraných společenstvech břehových porostů postupně snižovat, podobně jako např. u společenstev s olší lepkavou a šedou v případech poškození plísní olšovou. S tím souvisí nutnost zvýšení podílu náhradních taxonů, mezi které např. patří javor klen, stromcha obecná, dub letní apod. [22].

Přírodní prostředí je samozřejmě velmi variabilní systém a v rozsahu napadení a významu nekrozy jasanu se jistě uplatňují i jiné faktory než vlhkost prostředí a sklon terénu – např. expozice, zápoj porostu, objem korun hostitele a další.

Poděkování: Práce byla podpořena projekty Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy č. ČZU CIGA20124309, ČZU IGAFID20124354 a Ministerstva zemědělství České republiky č. NAZV QI92A207. Dále bychom chtěli poděkovat Ing. Jiřímu Kučerovi (EMS Brno) a Dr. Janu Pívcovi (ČZU FAPPZ KAB) za cenné rady a konzultace a Ing. Alexandru Hrozkovi (SCHKO Lužické hory) za pomoc při instalaci datalogerů.

Literatura

- Černý, K.; Gregorová, B.; Holub, V.; Strnadová, V.; Mrázková, M. (2007): Grafioza jilmů v ČR – fytopatologické a ekologické souvislosti. In: Dreslerová et Packová / ed./ Ochráněné dřeviny České republiky. Geobiocenologické spisy 12, s. 30–43.
- Černý, K.; Strnadová, V. (2010): Phytolithora Alder Decline: Disease Symptoms, Causal Agent and its Distribution in the Czech Republic. *Plant Protection Science* 46, p. 12–18.
- Gregorová, B.; Černý, K.; Holub, V.; Strnadová, V.; Rom, J.; Šumpich, J.; Kloudová, K. (2006): Poškození dřevin a jeho příčiny. AOPK. Praha, VUKOZ. Průhonice, Praha, 504 s.
- Kowalski, T.; Holdenrieder, O. (2008): A new fungal disease of ash in Europe (in German). *Schweizerische Zeitschrift für Forstwesen* 159, p. 45–50.
- Kowalski, T. (2006): *Chalara fraxinea* sp. nov. associated with dieback of ash (*Fraxinus excelsior*) in Poland. *Forest Pathology* 36, p. 264–270.
- Queloz, V.; Grünig, C. R.; Berndt, R.; Kowalski, T.; Sieber, T. N.; Holdenrieder, O. (2011): Cryptic speciation in *Hymenoscyphus albidus*. *Forest Pathology* 41, p. 133–142.
- Zhao, Y. J.; Hosoya, T.; Baral, H. O.; Hosaka, K.; Kakishima, M. (2012): *Hymenoscyphus pseudoalbidus*, the correct name for *Lambertella albida* reported from Japan. *Mycotaxon* 122, p. 25–41.
- Slavík B. [ed.] (1997): Květena České Republiky 5. Academia Praha, s. 447–450.
- Úradníček, I.; Maděra, P.; Tichá, S.; Koblížek, J. (2009): Dřeviny České republiky. Lesnická práce, Kostelec n. Č. L., druhé vydání, 368 s.
- Bakys, R.; Vasaitis, R.; Barklund, P.; Ilmarinen, K.; Stenlid, J. (2009): Investigations concerning the role of *Chalara fraxinea* in declining *Fraxinus excelsior*. *Plant Pathology* 58, p. 284–292.
- Timmermann, V.; Borja, I.; Hietala, A. M.; Kirisits, T.; Solheim, H. (2011): Ash dieback: pathogen spread and diurnal patterns of ascospore dispersal, with special emphasis to Norway. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 41, p. 14–20.
- Kirisits, T.; Halmsthalger, E. (2008): Eschenpilz nachgewiesen. *Forstzeitung* 2, p. 32–33.
- Kowalski, T.; Lukomska, A. (2005): The studies on ash dying (*Fraxinus excelsior* L.) in the Wloszczowa Forest Unit stands. *Acta Agrobotica* 58, p. 429–439.
- Havrdová, L.; Černý, K. (2012): Invaze *Chalara fraxinea* v CHKO Lužické hory – předběžné výsledky výzkumu. *Acta Pruhoniciana* 100, s. 137–145.
- Černý, K. (2011): Nebezpečné patogeny lesních dřevin *Phytophthora alni* a *Chalara fraxinea*: rozšíření, význam a možná rizika vyplývající z jejich zdomácnění. *Zpravodaj Ochrany Lesa* 15, s. 71–75.
- Jankovský, L.; Holdenrieder, O. (2009): *Chalara fraxinea* – Ash Dieback in the Czech Republic. *Plant Protection Science* 45, p. 74–78.
- Kowalski, T.; Holdenrieder, O. (2009): The teleomorph of *Chalara fraxinea*, the causal agent of ash dieback. *Forest Pathology* 39, p. 304–308.
- Havrdová, L.; Černý, K. (2013): Význam vlhkosti vzduchu v epidemiologii nekrozy jasanu – předběžné výsledky výzkumu. *Zprávy lesnického výzkumu* 58 (4), s. 347–352.
- Sinclair, W. A.; Lyon, H. H. (2005): Diseases of trees and shrubs. Ithaca, Cornell University Press, second edition, 660 p.
- Černý, K.; Strnadová, V.; Hrubá, T. (2011): Rozšíření fytoftorového onemocnění olší v České republice. Specializovaná mapa s odborným obsahem. NAZV QI 92A207. Certifikace 18.3.2011 MZe. (č.j. 54683/2011-MZE), 4 s.
- Černý, K.; Strnadová, V.; Baroš, A.; Holub, V.; Velebil, J. (2013): Zdravotní stav dřevin břehových porostů a významná fytopatologická rizika. In: Baroš A. /ed./ Břehové porosty vodních toků. Sborník ze semináře, 19.11.2013, Průhonice, s. 57–65.
- Černý, K.; Strnadová, V.; Velebil, J.; Baroš, A.; Bulíř, P. (2013): Obnova a dlouhodobá péče o břehové porosty. Metodika, VÚKOZ Průhonice, 136 s.
- Velebil, J. (2013): Druhová diverzita modelových úseků břehových porostů v povodí Vltavy a jejich geobiocenologická klasifikace. In: Baroš A. /ed./ Břehové porosty vodních toků. Sborník ze semináře, 19.11.2013, Průhonice, s. 37–50.

Ing. Ludmila Havrdová^{1, 3)} (autor pro korespondenci)
Ing. Petr Záborský²⁾
Mgr. Karel Černý³⁾

¹⁾ Česká zemědělská univerzita v Praze,
Fakulta lesnická a dřevařská
Kamýcká 129
165 21 Praha 6 – Suchdol
havrdova@ld.czu.cz

²⁾ Česká zemědělská univerzita v Praze,
Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů
Kamýcká 129
165 21 Praha 6 – Suchdol

³⁾ Výzkumný ústav Silva Taroucy pro krajinu
a okrasné zahradnictví, v. v. i.
Květnové nám. 391
252 43 Průhonice

The high air humidity determines the high damage of bank-side stands by ash dieback (Havrdová, L.; Záborský, P.; Černý, K.)

Abstract

New alien invasive fungal pathogen *Hymenoscyphus pseudoalbidus* (*Chalara fraxinea*) causes intensive ash dieback of common and narrow-leaved ashes recently. The exploration of impact of the disease in different types of ash stands and environmental factors affecting the extent of damage has been performed in model area in PLA Lusatian Mountains since 2011. In 2012, the sensors Datalogger Minikin T11i (EMS Brno) measuring air humidity were installed in 50 investigated permanent plots respecting the diversity of ash stands in the area. Air humidity was measured 4.5 m above the ground level in centres of permanent plots. The data were collected in 15-min interval during the time of ascospore spreading from July to August. Moreover, the slope of localities was measured with using of clinometer. The acquired data were given into the connection with level of ash dieback. It was found out, that the highest disease level presented in bankside stands and ash-alder mixed forests – i.e. in stands with highest air humidity and lowest slopes. The lowest damage was determined in scattered plantings in open landscape which are characterised by lowest air humidity and higher slope. Bankside stands, alluvial- and bottomland forests are the most endangered vegetation types by the invasion.

Key words

ash dieback – *Hymenoscyphus pseudoalbidus* – *Chalara fraxinea* – riparian stands – *Fraxinus excelsior*

Tento článek byl recenzován a je otevřen k diskusi do 31. ledna 2015. Rozsah diskusního příspěvku je omezen na 2 normostrany A4, a to včetně tabulek a obrázků. Příspěvky pošlejte na e-mail stransky@vodnihospodarstvi.cz.

5.4. Odlišnost české a evropské populace *H. fraxineus*

Local population structure of *Hymenoscyphus fraxineus* surveyed by an enlarged set of microsatellite markers

Zuzana Haňáčková, Ondřej Koukol, Ludmila Havrdová, Adrin Gross

2015

Forest Pathology (Early view: DOI: 10.1111/efp.12185)

Přijato k publikaci

Local population structure of *Hymenoscyphus fraxineus* surveyed by an enlarged set of microsatellite markers

By Z. Haňáčková^{1,2,5}, O. Koukol², L. Havrdová^{1,3} and A. Gross⁴

¹Department of Biological Risks, Silva Tarouca Research Institute for Landscape and Ornamental Gardening Publ. Res. Inst., Květnové náměstí 391, 252 43 Průhonice, Czech Republic; ²Department of Botany, Faculty of Science, Charles University in Prague, Benátská 2, 128 01 Prague, Czech Republic; ³Faculty of Forestry and Wood Sciences, Czech University of Life Sciences Prague, Prague, Czech Republic;

⁴Forest Pathology and Dendrology, Institute of Integrative Biology (IBZ), ETH Zurich, Zurich, Switzerland;

⁵E-mail: Zuzana.Hanackova@vukoz.cz (for correspondence)

Summary

The population structure of *Hymenoscyphus fraxineus*, the causal agent of ash dieback, was assessed at four closely located sites in the Czech Republic. To analyse the genetic variation, one Swiss and one Norwegian population with known population structures were selected as reference points. The analysis was performed using 16 previously published and five newly developed microsatellite markers. The quality of the new markers was assessed by sequencing the flanking region, identifying the type of the mutation and analysing the inheritance and linkage between all pairs of loci. In addition, markers were tested on 45 Japanese strains to confirm their usability on native *H. fraxineus* populations in Asia. One of the new markers was monomorphic in all European populations and one marker exhibited a high percentage of null alleles in the Japanese samples. Twenty markers in the four Czech populations showed lower average gene diversity than in the other two European populations. One Czech population significantly differed from all the others, with a pairwise G_{ST} of approximately 0.2, the lowest allelic richness and very low average gene diversity, likely resulting from a founder effect. The amount of genetic differentiation between the four neighbouring Czech populations exceeds the expected value from previous Europe-wide population studies and suggests that local population dynamics can affect the population structure of *H. fraxineus*.

1 Introduction

Hymenoscyphus fraxineus is an invasive ascomycetous pathogen, which was likely introduced from Asia (Zhao et al. 2012; Gross et al. 2014a). Since the 1990s, it has caused ash dieback in large areas of Europe (Timmermann et al. 2011). Preliminary population genetic investigations have revealed high genotypic diversity, indicating a high rate of sexual reproduction (Rytönen et al. 2011; Kraj et al. 2012). Subsequent studies concerning the population structure of *H. fraxineus* were in partial disagreement (Bengtsson et al. 2012; Gross et al. 2012, 2014a; Kraj et al. 2012; McKinney et al. 2012; Kraj and Kowalski 2014). For example, using microsatellite markers, Gross et al. (2014a) and Bengtsson et al. (2012) demonstrated low genetic structure between populations from several European countries and a study on populations in Denmark (McKinney et al. 2012) yielded corresponding results. By contrast, using RAMS markers, Kraj et al. (2012) have found a well-defined population structure, while differences between lowland and highland populations were shown. Because only isolates from necrotic lesions were used, this finding might be restricted to pathogen subpopulations able to induce stem necroses. However, similar results were obtained with isolates from ascospores (Kraj and Kowalski 2014). Both studies characterized lowland populations by fewer number of markers, fewer polymorphic loci as well as a lesser degree of intra-population genetic variability.

Comparison of European and Japanese populations of *H. fraxineus* showed a much higher allelic richness in Japan (Gross et al. 2014a). There are, however, only eight microsatellite markers applicable for both groups thus far, whereas more loci are required to increase the resolution of genetic comparisons and to more accurately localize the source population.

In the Czech Republic, *H. fraxineus* was initially isolated in 2007 from *Fraxinus excelsior* cv. Pendula in the Křtiny Arboretum (South Moravia). Nevertheless, the first infections had likely occurred already by the end of the 1990s (Jankovský and Holdener 2009), and at present, ash dieback can be found throughout the Czech Republic. The level of infection, however, differs among the vegetation types, where humidity seems to be the limiting factor for the pathogen (Havrdová and Černý 2013).

The aim of this study was to examine the population structure of *H. fraxineus* at four sites within the Czech Republic. Two other populations with known population structure from Switzerland and Norway were used to compare and interpret our results. The analyses were carried out using 21 microsatellite markers, five of which were newly developed, and their suitability was tested on populations from the native range (Japan) and from the invaded area (Europe).

2 Materials and methods

2.1 Development of new microsatellite markers

Previously described sequencing data (Gross et al. 2012) were used to mine for microsatellite repeat loci. Twenty loci were selected, and primers that amplified a fragment of approximately 1 kb were designed with PRIMER3WEB (<http://bioinfo.ut.ee/>

Received: 17.10.2014; accepted: 26.1.2015; editor: M. Cleary

<http://wileyonlinelibrary.com/>

mprimer3/) (Table S1). Each locus was amplified in eight test strains of *H. fraxineus* (Table S2), and products were visualized on a 1 % (w/v) agarose gel. Subsequently, eight promising loci (without any null-alleles in test strains) were selected and all test strains were partially sequenced with the corresponding forward primer. Sequences were aligned using the multiple sequence alignment tool CLUSTALW, implemented in GENEIOUS v6.1.3 (Biomatters Ltd., Auckland, New Zealand). Two loci exhibited no polymorphisms, whereas six loci revealed size differences of which five were due to variation in the microsatellite repeat number. Sequenced alleles of the five polymorphic loci were submitted to GenBank (Table S3). For the five loci with mutations in the microsatellite repeat, new primers were designed and the forward primers were directly labelled with a fluorescent dye. A multiplex PCR (multiplex PCR no. 4) was developed, allowing to amplify all five loci in a single PCR run (Table S4).

2.2 Testing the new microsatellite markers

Mendelian inheritance of microsatellite markers was tested on 30–31 progeny isolates derived from three different apothecia collected in the field. A chi-squared-test was used to test for a 1 : 1 segregation of alleles (Table 1).

Linkage disequilibrium among all pairs of polymorphic loci, including 15 of the previously developed microsatellite markers, was calculated in ARLEQUIN v. 3.5.1.3 (Excoffier and Lischer 2010) using 10 000 steps in the Markov chain and 10 000 dememorization steps. The significance level $\alpha = 0.05$ was adjusted by the sequential Bonferroni correction procedure for each pair of loci (Rice 1989).

In addition, the microsatellite markers were tested on a set of 45 isolates from Japan (subsample of population JP_Sugadaira of Gross et al. 2014a) because previous studies revealed several microsatellite markers with a high percentage of amplification failures on strains from the native range of the fungus.

2.3 Sampling, isolation and microsatellite genotyping

Sampling of 1-year-old necrotic shoots was performed at four sites in the north of the Czech Republic, between February and April 2012 (Table 2, Fig. 1). The study sites were two nurseries (Ploužnice, Krásné Pole), a young ash plantation (Deštná) and a site with natural ash seedlings (Lovečkovice), located 21–37 km apart (Table 2). At each site, *H. fraxineus* was isolated from 20 necrotic lesions. Pieces of sapwood from the whole lower border of necrotic lesions were surface-sterilized as follows: 10 s in ethanol (96%), 10 s in sodium hypochlorite (4.7% active chlorine), 10 s in ethanol (96%), a final wash in distilled water and drying on sterile paper tissue. Sapwood pieces were placed on malt extract agar with streptomycin (composition per 1 l: malt extract 30 g, peptone 5 g, agar 15 g, streptomycin 100 mg – added after autoclaving) and incubated at 18°C. Outgrowing mycelia with morphological features of *H. fraxineus* were kept on wort agar prepared from brewer's wort (final sucrose content 2% w/v). One to two strains from each lesion were analysed (however, it should be noted that two strains from a single lesion were isolated only in two cases in the Deštná population). The total number of strains (isolates) per population is shown

Table 1. Segregation patterns of four polymorphic microsatellite markers in progeny genotypes of three different apothecia.

Apothecia	Polymorphic locus	Allele size 1 [bp] ¹	Allele size 2 [bp] ¹	Total progeny genotypes	p – χ^2 test
Fk02	mHp_076105	197 (16)	201 (14)	30	0.72
Fk02	mHp_076166	155 (15)	184 (15)	30	1.00
Fk08	mHp_068858	120 (16)	129 (14)	30	0.72
Fk08	mHp_076166	155 (14)	184 (16)	30	0.72
Fk08	mHp_086811	151 (17)	161 (13)	30	0.47
Fk19	mHp_068858	120 (14)	129 (17)	31	0.59
Fk19	mHp_076166	155 (12)	184 (19)	31	0.21

¹Number of corresponding genotypes are given in parentheses.

Table 2. Characteristics of study sites and *Hymenoscyphus fraxineus* populations.

Study site	Country	Coordinates		Sample size	Altitude (m.a.s.l)	Stand character	Tree height (m)	Allelic richness ¹	Ø number of alleles per locus	Gene diversity H_e
Lovečkovice	CZ	50.62083N	14.26287E	13	420–435	Natural seeding	0.2	1.74	1.75	0.30
Deštná	CZ	50.52201N	14.51732E	19	240	Planting	4	1.62	1.70	0.21
Ploužnice	CZ	50.63314N	14.76381E	19	291	Nursery	1	1.78	1.85	0.31
Krásné Pole	CZ	50.85193N	14.50256E	16	440	Nursery	0.5	1.90	1.95	0.35
Ebikon	CH	47.07412N	8.30381E	23	450	NA	NA	1.88	2.00	0.36
Oslo	N	59.92831N	10.69423E	18	43	NA	NA	1.86	1.90	0.38
Sugadaira	JP	36.52022N	138.35101E	45	1317	Natural forest	>20	–	–	–

NA, not available.

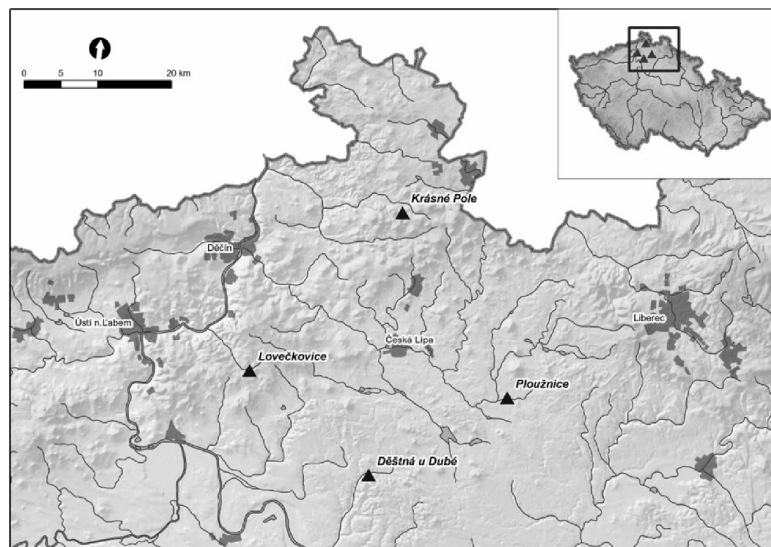


Fig. 1. Schematic map of northern Czech Republic (entire country in the upper right corner) showing the localities of the four Czech populations incorporated in the study.

in Table 2. Another two of the previously analysed populations (see Gross et al. 2014a) were selected for comparing genetic patterns: one from Switzerland and one from Norway, both collected in 2010 (Table 2). Together, 108 strains of European *H. fraxineus* were analysed. Fungal DNA of the Czech populations was extracted by the ZR Fungal/Bacterial DNA kit (Zymo Research, Orange, CA, USA) according to the manufacturer's instructions.

All strains were genotyped with the new microsatellites described above and 16 microsatellites from Gross et al. (2012), using the adjusted multiplex PCRs specified in Table S4. Multiplex PCRs contained 2 μ l 5 \times reaction buffer (Promega, Dübendorf, Switzerland), 0.2 mM dNTP mix (Fermentas, St. Leon-Rot, Germany), primer concentrations as specified in Table S4 and 0.5 U GoTaq polymerase (Promega). PCRs and fragment analysis were carried out as described in Gross et al. (2012).

2.4 Population genetic analysis

Genetic analyses were conducted with 20 microsatellite markers. The mitochondrial locus mHp_mt_01 was excluded from the data because of frequent non-Mendelian inheritance, as identified in a previous study (Gross et al. 2014a). The R-package 'poppr v1.0.3' (R_Development_Core_Team 2009; Kamvar et al. 2014) was used to compute the number of multilocus genotypes and the index of association I_A (Brown et al. 1980; Smith et al. 1993). The I_A is expected to be zero if the alleles are distributed randomly between different genotypes, which would suggest random mating. The number of significant deviations from zero was tested by 1000 permutations using the allele permutation method of 'poppr'. The software SPAGe-DI 1.4c (Hardy and Vekemans 2002) was used for the determination of allelic richness (normalized to the smallest population size $N = 13$) and Nei's average gene diversity H_e (Nei 1987).

Pairwise population differentiation (G_{ST}) was calculated in ARLEQUIN 3.5.1.2 (Excoffier and Lischer 2010) and tested for significance by 10 000 permutations. Population structure was explored by principal component analysis (PCA) using the R-package 'ade4 v1.3-9.2' (Jombart 2008; R_Development_Core_Team 2009). As a comparison, the Bayesian model-based clustering algorithm of the software STRUCTURE 2.3.2 (Pritchard et al. 2000) was used. The program minimizes Hardy-Weinberg disequilibrium and the phase disequilibrium between loci within a given number of clusters K . After a burn-in period of 50 000 MCMC iterations, further 1 000 000 iterations were performed for ten independent runs for each K ranging from 1 to 8. No prior population information was supplemented, and the program was run under the admixture model with independent allele frequencies. The output of STRUCTURE was analysed with STRUCTURE HARVESTER WEB v0.6.93 to determine the optimal number of clusters K (Earl and vonHoldt 2012).

3 Results

3.1 New microsatellite markers for *Hymenoscyphus fraxineus*

Five new microsatellite markers were developed. The quality of the new markers was assessed by analysing (i) the type of the mutation between microsatellite alleles, (ii) their inheritance and (iii) the linkage among loci. In addition, to evaluate

their usability on native *H. fraxineus* populations, the markers were tested on 45 *H. fraxineus* strains originating from Japan.

The sequencing of the microsatellite flanking region identified two sequence variants per marker. The mutation leading to sequence length variation always occurred in the microsatellite repeat region (Table 3). However, in marker mHp_076166, two single base indels (insertion or deletion) were also found in the flanking region, one of which was only found in the reference sequence. All loci revealed 1–6 additional single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the flanking regions. In all but marker mHp_067560, the copy number of the microsatellite repeat motif differed by more than one repeat unit between the alleles. The onefold repeat shift at marker mHp_067560 was only detected once among all of the eight test strains (strain 2118_1, Table S3). In addition, a onefold repeat shift leading to a third allele at locus mHp_076166 was detected only once in a strain of the Czech population Ploužnice (Table 3). This allele, however, was not sequenced.

Microsatellite inheritance analysis revealed that of 30–31 progeny isolates within three different apothecia, only mHp_067560 was not polymorphic. The segregation patterns of the remaining markers did not significantly deviate from the 1 : 1 ratio expected under Mendelian inheritance (Table 1).

Significant pairwise linkage between old and new markers was only identified in individual cases. In addition, old markers mHp_080497 and mHp_073013 were in pairwise linkage in two Czech populations, that is Deštná and Lovečkovice.

Markers mHp_068858, mHp_076105 and mHp_086811 were polymorphic in Europe and also performed well on Japanese strains (Table 4). Locus mHp_076166 was polymorphic in Europe but failed to be amplified in 11 (24.4%) Japanese strains. In return, locus mHp_067560 was monomorphic for European populations (with the exception of the second allele found in the test population) but polymorphic in Japan (Table S3). Average gene diversity of the new microsatellites was 0.31 for European strains and 0.68 for Japanese strains (Table 4). The number of alleles varied from 1 to 3 in Europe, whereas the Japanese population showed 5–21 alleles per locus.

3.2 Local genetic structure in the Czech Republic and comparison with two other European *Hymenoscyphus fraxineus* populations

All 108 European strains studied were recognized as individual multilocus genotypes. In addition, the two strains isolated from one lesion in the Deštná population yielded different genotypes. The index of association was not significantly different from zero in all populations (data not shown), indicating random recombination between loci. The number of alleles per locus varied from 1.70 to 1.95 in the Czech populations, whereas it was 2.00 for the Swiss population and 1.90 for the Norwegian population (Table 2). Likewise, gene diversity was lower in the Czech populations, ranging from 0.21 to 0.35,

Table 3. New microsatellite loci and their characteristics in European populations (based on sequencing data and fragment analysis, see also Table S3): The periode size, number of alleles, microsatellite repeat motif, repeat copy number; sequence and fragment lengths and the type of the mutation (MS, microsatellite repeat; SNP, single nucleotide polymorphism; indels, insertion/deletion) is given.

Locus name	Period size [bp]	Repeat copy number	Repeat motif	Number of alleles	Allele size (bp)	Fragment lengths	Mutation type
mHp_067560	3	7, 8	GAG	2	241, 245	242 ¹ , 245	MS, 3 SNPs
mHp_068858	3	6, 9	CAA	2	124, 133	120, 129	MS, 2 SNPs
mHp_076105	4	5, 6	ATGG	2	194, 198	197, 201	MS, 4 SNPs
mHp_076166	3	7, 17, 18	CTT	3	151, 180	155, 184, 187 ²	MS, 2 single bp indels, 6 SNPs
mHp_086811	3	5, 8	GAG	2	153, 162	151, 161	MS, 1 SNP

¹Allele has been detected in the polymorphism screening only.
²Allele only found in a single strain in the Ploužnice population; allele not sequenced.

Table 4. Diversity of five new microsatellites in European and Japanese samples.

Locus	Europe (N = 108)			Japan (N = 45)			Recommended usage
	Number of alleles	Per cent of null alleles	ϕH_c ¹	Number of alleles	Per cent of null alleles	ϕH_c	
mHp_067560	1 ²	0.0	0.00	6	0.0	0.56	Only Japanese populations, monomorph in Europe
mHp_068858	2	0.0	0.49	7	0.0	0.76	European and Japanese populations
mHp_076105	2	0.0	0.09	10	0.0	0.58	European and Japanese populations
mHp_076166	3	0.0	0.50	21	24.4	0.95	Only European populations, null alleles in Japanese samples
mHp_086811	2	0.0	0.50	5	0.0	0.54	European and Japanese populations

¹Average gene diversity.
²A second allele was only found in the test strains (see Table S2).

Table 5. Matrix of pairwise population differentiation (G_{ST}) for Czech, Swiss and Norwegian populations of *Hymenoscyphus fraxineus*.

Population	Lovečkovice	Deštná	Ploužnice	Krásné Pole	Ebikon	Oslo
Lovečkovice	0.00000					
Deštná	0.20975*	0.00000				
Ploužnice	0.00799	0.09916*	0.00000			
Krásné Pole	0.00943	0.16511*	0.01850	0.00000		
Ebikon	0.03438	0.20506*	0.04983*	0.01607	0.00000	
Oslo	0.06955*	0.28307*	0.10886*	0.03879*	0.01730	0.00000

*Significant at $p < 0.05$.

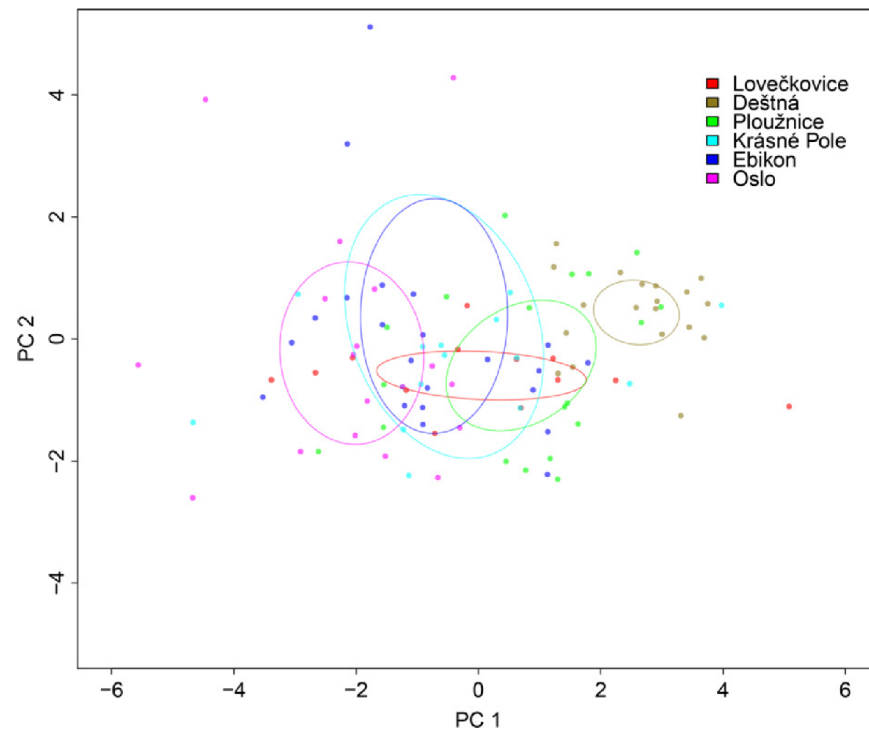


Fig. 2. Principal component analysis (PCA) of the Czech populations and the two reference populations from Norway and Switzerland. Individual populations are indicated by inertia ellipses and the different colours (see legend). Dots represent individual population members. PC1 explains 10.96% and PC2 8.1% of the total variance.

while it was 0.36 and 0.38 in the Swiss and Norwegian populations, respectively (Table 2). The Deštná population showed the lowest gene diversity ($H_e = 0.21$) and significantly differed from all other tested populations, with the pairwise population G_{ST} value ranging from 0.10 to 0.28 (Table 5). G_{ST} values between the other Czech populations ranged from 0.01 to 0.02 and were not significant. However, comparisons to other European population were higher ($G_{ST} = 0.02$ – 0.11) and mostly significant. The PCA shows that the Deštná population is quite distinct. The other populations partially overlap and are not clearly separable from each other (Fig. 2).

Two clusters proved to be the best model, as determined by STRUCTURE analysis and subsequent analysis in Structure Harvester (Fig. 3). Log likelihood values for $K = 2$ were significantly better than for $K = 1$ (Wilcoxon rank sum test, $p < 0.001$) (Fig. 3b). In addition, delta (K) plots showed the highest value for $K = 2$ (Fig. 3c). However, the probability plots indicated that individuals of different populations were not allocated to one or the other cluster with a high confidence (Fig. 3a). Similarly, in all but the Deštná population, genotypes assigned to either cluster were present. Only in the Deštná population were individuals consistently assigned to the same cluster with moderate to high confidence.

4 Discussion

During our study of the genetic diversity of *H. fraxineus* at four sites in the Czech Republic, 20 microsatellite markers were used in total. Five new markers were developed and their quality assessed carefully. Three markers were identified as

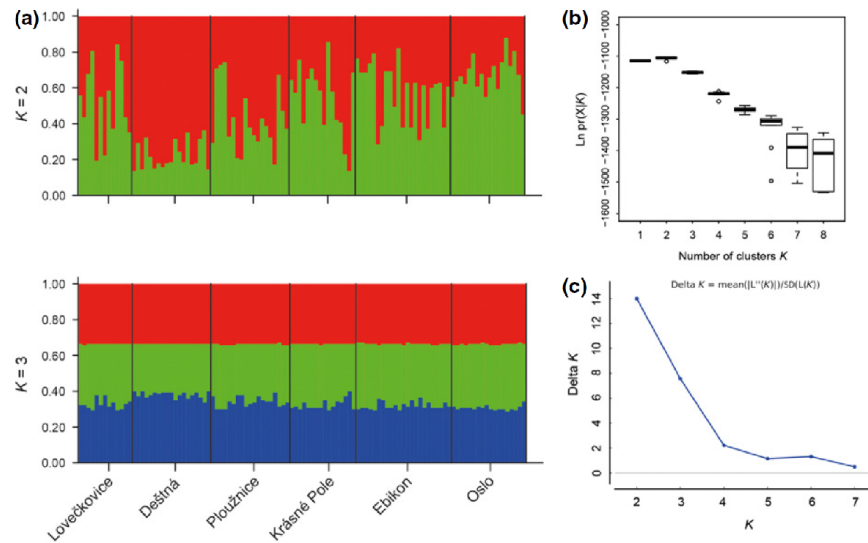


Fig. 3. Bayesian clustering analysis using the software STRUCTURE. (a) Assignment probability plots for $K = 2$ and $K = 3$ clusters of European *Hymenoscyphus fraxineus* genotypes. Individuals are represented by narrow bars divided into K segments showing the mean membership coefficient of an individual for a specific cluster. Vertical black lines delimit the populations that are indicated underneath the bar plots. (b) Boxplots of the log likelihood ($\text{LN pr}(X|K)$) of ten individual runs per cluster ranging from $K = 1$ to $K = 8$, indicating that $K = 2$ is the model with the highest likelihood score. (c) Delta (K) plot to determine the optimal number of clusters in STRUCTURE analysis as suggested by Evanno et al. (2005). The highest delta (K) is observed at $K = 2$. However, the method is unable to differentiate between $K = 1$ and $K = 2$.

appropriate to compare the genetic diversity between populations in Europe and Japan. Only eight markers have proven valuable for this purpose so far (Gross et al. 2014a), and additional markers are necessary to elucidate the invasion history of *H. fraxineus*. Average gene diversity ($H_e = 0.29$) of Czech populations was considerably lower when compared to the two reference populations and to the European average $H_e = 0.35$ reported by Gross et al. (2014a). Only the Krásné Pole population reached a similar gene diversity ($H_e = 0.35$). The Deštná population represented an outlier in terms of low genetic diversity, which is likely the result of a founder event. A founder effect within the already bottlenecked European population has already been reported in the CH_Wilderswil population in a previous study (Gross et al. 2014a).

Interestingly, two strains isolated from the same lesion showed different genotypes. The possibility of multiple infections from one leaf scar has already been indicated by Bengtsson et al. (2014). To confirm this, a more precise tracking of the infection event is necessary because the detection of multiple strains could also have been caused by the fusion of lesions from two nearby leaf scars or the combination of lesions from a leaf scar and direct entry, (e.g. through a lenticel).

Concluding from the allelic diversity of the markers, Czech populations of *H. fraxineus* have a similar gene pool as that found in other European populations. Unsurprisingly, Czech *H. fraxineus* derived obviously from other European *H. fraxineus* populations. However, the considerable variation in genetic diversity and the two relatively undefined clusters found by STRUCTURE analysis among the geographically proximal populations was an unexpected result. *Hymenoscyphus fraxineus* was already present throughout the country (L. Havrdová, personal communication) and had been reported in all neighbouring countries (see fig. 1 in Timmermann et al. 2011) at the time of sampling. Ascospores of the pathogen are distributed by wind (Timmermann et al. 2011), and, as is established from disease monitoring programs, the disease front can move up to 75 km per year (Gross et al. 2014b), implicating a high migration potential. High migration rates lead to the prevention or dissolution of the population genetic structure (Wright 1949; Slatkin 1987), and this was shown for *H. fraxineus* in a Europe-wide study incorporating 32 populations and more than 1200 strains (Gross et al. 2014a). Therefore, factors acting against migration might have led to the observed pattern. Chandelier et al. (2014) showed a logarithmical decrease in the amount of *H. fraxineus* ascospores as height from the ground increased. Therefore, a few local genotypes may have generated a higher and earlier infection pressure (especially in the low and dense Czech stands) than *H. fraxineus* spores from surrounding areas, which may have hindered migration. Alternatively, other unknown epidemiological dynamics, for example low density of *F. excelsior* stands in surrounding areas or unfavourable conditions for infections, are also conceivable. Indeed, the ash stand in Deštná is surrounded by pine forests on sandy ground and agricultural fields with a very low density of ash. However, the result must not be overinterpreted because G_{ST} values between Czech populations other than Deštná were small and insignificant, and also the differences from the two foreign reference populations were not much higher. Our study is difficult to compare to those of (Kraj et al. 2012; Kraj and Kowalski 2014) which identified a clear difference between lowland and highland populations using RAMS markers. All our populations were sampled at a similar elevation and we used a single-locus, codominant marker type. There are several well-known technical and analytical

drawbacks of multilocus markers such as RAMS (see Sunnucks 2000), and therefore, the interesting findings of Kraj et al. should be challenged using more reliable genetic markers in the future.

Our results clearly point to our limited knowledge about epidemiology, disease dynamics and the ecological factors shaping them. Holdenrieder et al. (2004) called for transdisciplinary cooperation of forest pathologists and landscape ecologists, and such collaborative studies are needed to fully understand the forest pathogen *H. fraxineus*.

Acknowledgements

We would like to thank O. H. and the Genetic Diversity Centre (GDC) of ETH Zurich for providing their laboratory facilities. This study was supported by Ministry of Agriculture of the Czech Republic no. NAZV QJ1220218, by Institutional Support for Science and Research of the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic, by a grant from COST Action FP1103 FRAXBACK for the short-term scientific mission of Z. H. in Switzerland.

References

- Bengtsson, S. B. K.; Vasaitis, R.; Kirisits, T.; Solheim, H.; Stenlid, J., 2012: Population structure of *Hymenoscyphus pseudoalbidus* and its genetic relationship to *Hymenoscyphus albidus*. *Fungal Ecol.* **5**, 147–153.
- Bengtsson, S. B. K.; Barklund, P.; von Brömssen, C.; Stenlid, J., 2014: Seasonal pattern of lesion development in diseased *Fraxinus excelsior* infected by *Hymenoscyphus pseudoalbidus*. *PLoS ONE* **9**, e76429.
- Brown, A. H. D.; Feldman, M. W.; Nevo, E., 1980: Multilocus structure of natural populations of *Hordeum spontaneum*. *Genetics* **96**, 523–536.
- Chandelier, A.; Helson, M.; Dvorak, M.; Gisler, F., 2014: Detection and quantification of airborne inoculum of *Hymenoscyphus pseudoalbidus* using real-time PCR assays. *Plant. Pathol.* **63**, 1296–1305.
- Earl, D. A.; vonHoldt, B. M., 2012: STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conserv. Genet. Resour.* **4**, 359–361.
- Evanno, G.; Regnaut, S.; Goudet, J., 2005: Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Mol. Ecol.* **14**, 2611–2620.
- Excoffier, L.; Lischer, H. E. L., 2010: Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol. Ecol. Res.* **10**, 564–567.
- Gross, A.; Grüning, C. R.; Queloz, V.; Holdenrieder, O., 2012: A molecular toolkit for population genetic investigations of the ash dieback pathogen *Hymenoscyphus pseudoalbidus*. *Forest Pathol.* **42**, 252–264.
- Gross, A.; Hosoya, T.; Queloz, V., 2014a: Population structure of the invasive forest pathogen *Hymenoscyphus pseudoalbidus*. *Mol. Ecol.* **23**, 2943–2960.
- Gross, A.; Holdenrieder, O.; Pautasso, M.; Queloz, V.; Sieber, T. N., 2014b: *Hymenoscyphus pseudoalbidus*, the causal agent of ash dieback. *Mol. Plant Pathol.* **15**, 109–117.
- Hardy, O. J.; Vekemans, X., 2002: spagedi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Mol. Ecol. Notes* **2**, 618–620.
- Havrdová, L.; Černý, K., 2013: The importance of air humidity in ash dieback epidemiology – preliminary results (in Czech with Engl. summary). *Rep. Forest. Res.* **58**, 347–352.
- Holdenrieder, O.; Pautasso, M.; Weisberg, P. J.; Lonsdale, D., 2004: Tree diseases and landscape processes: the challenge of landscape pathology. *Trends Ecol. Evol.* **19**, 446–452.
- Jankovský, L.; Holdenrieder, O., 2009: *Chalara fraxinea* – ash dieback in the Czech Republic. *Plant Prot. Sci.* **45**, 74–78.
- Jombart, T., 2008: adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics* **24**, 1403–1405.
- Kamvar, Z. N.; Tabima, J. F.; Grunwald, N., 2014: The poppr R package for genetic analysis of populations with mixed (clonal/sexual) reproduction. *PeerJ* **2**, e281. doi: 10.7717/peerj.281
- Kraj, W.; Kowalski, T., 2014: Genetic variability of *Hymenoscyphus pseudoalbidus* on ash leaf rachises in leaf litter of forest stands in Poland. *J. Phytopathol.* **162**, 218–227.
- Kraj, W.; Zarek, M.; Kowalski, T., 2012: Genetic variability of *Chalara fraxinea*, dieback cause of European ash (*Fraxinus excelsior* L.). *Mycol. Prog.* **11**, 37–45.
- McKinney, L. V.; Thomsen, I. M.; Kjær, E. D.; Bengtsson, S. B. K.; Nielsen, L. R., 2012: Rapid invasion by an aggressive pathogenic fungus (*Hymenoscyphus pseudoalbidus*) replaces a native decomposer (*Hymenoscyphus albidus*): a case of local cryptic extinction? *Fungal Ecol.* **5**, 663–669.
- Nei, M., 1987: *Molecular Evolutionary Genetics*. New York, NY: Columbia University Press, 512 pp.
- Pritchard, J. K.; Stephens, M.; Donnelly, P., 2000: Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155**, 945–959.
- R_Development_Core_Team, 2009: R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 409 pp.
- Rice, W. R., 1989: Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* **43**, 223–225.
- Rytönen, A.; Lilja, A.; Drenkhan, R.; Gaitnieks, T.; Hantula, J., 2011: First record of *Chalara fraxinea* in Finland and genetic variation among isolates sampled from Åland, mainland Finland, Estonia and Latvia. *Forest Pathol.* **41**, 169–174.
- Slatkin, M., 1987: Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science* **236**, 787–792.
- Smith, J. M.; Smith, N. H.; O'Rourke, M.; Spratt, B. G., 1993: How clonal are bacteria? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 4384–4388.
- Sunnucks, P., 2000: Efficient genetic markers for population biology. *Trends Ecol. Evol.* **15**, 199–203.
- Timmermann, V.; Børja, I.; Hietala, A. M.; Kirisits, T.; Solheim, H., 2011: Ash dieback: pathogen spread and diurnal patterns of ascospore dispersal, with special emphasis on Norway. *EPP0 Bull.* **41**, 14–20.
- Wright, S., 1949: The genetical structure of populations. *Ann. Eugen.* **15**, 323–354.
- Zhao, Y.-J.; Hosoya, T.; Baral, H.-O.; Hosaka, K.; Kakishima, M., 2012: *Hymenoscyphus pseudoalbidus*, the correct name for *Lambertella albida* reported from Japan. *Mycotaxon* **122**, 25–41.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Table S1. Initial amplification of putatively polymorphic regions containing a microsatellite repeat.

Table S2. Strains used for the initial polymorphism screening.

Table S3. Sequenced alleles and their GenBank accession numbers.

Table S4. Four multiplex PCRs as used to genotype Czech populations.

5.5. Faktory ovlivňující výskyt a význam patogenu

The factors affecting distribution and impact of ash dieback in rural landscape

Ludmila Havrdová, Dan Zahradník, Dušan Romportl, Karel Černý

2015

Forest Ecology and Management

Manuskript před odesláním

Factors affecting the distribution and impact of ash dieback in a rural landscape

Ludmila Havrdová^{1,2}, Daniel Zahradník¹, Dušan Romportl¹, Karel Černý¹

¹Department of Biological Risks, Silva Tarouca Research Institute for Landscape and Ornamental Gardening Publ. Res. Inst., Květnové náměstí 391, 252 43 Průhonice, Czech Republic ²Faculty of Forestry and Wood Sciences, Czech University of Life Sciences Prague, Prague, Czech Republic

Abstract

Extensive investigation of the impact of ash dieback on different rural vegetation types (solitaires, scattered plantations, riparian stands, scree- and ash-alder alluvial forests) was performed in the Lusatian Mts. (the Czech Republic) between 2011 and 2013. The rate of ash dieback and 30 environmental variables were investigated in 80 research plots with a total of 1045 evaluated trees.

The developed model (GLM) explained ca 27% of the data variability. Particular models for each vegetation type were developed; importantly, these models differed from each other and explained 28–46% of the data variability.

The variables that positively affected the disease impact included the host crown area, rate of ash in the stands, tree layer area, canopy closure, north aspect, shrub and herbaceous layer canopy and several terrain morphology characteristics (vertical heterogeneity and standard deviation of TPI). Tree height, the distance and damage of the nearest host as well as the water source distance, slope and its SD affected the impact negatively. The coincidental attack of the trees by *Armillaria* sp. and *Hylesinus fraxini* had a positive impact on disease progress, whereas the presence of *Nectria* sp. and *Eriophyes fraxinivorus* conclusively decreased progress, most likely via the induction of secondary metabolites.

The highly conclusive regression ($r=0.45$, $p<0.0001$) of ash dieback on the number of days with an air humidity of $>95\%$ between 6–11 a.m. in the main period of ascospore spread was identified. Because the air humidity near the ground is highly affected by local factors, a GLM model explaining the variability of air humidity with that of measured factors was developed. This model convincingly explained 77% of the variability attributed to air humidity, and local factors (TPI5 and SD of TPI5, aspect, slope, altitude, distance from open water, tree and shrub layer canopies, tree stand and tree crown height, etc.) greatly affected the disease impact related to air humidity. Moreover, the landscape form was identified as a factor (most likely via humidity) that affects the impact of the disease; for example, the stands at mountain tops and slopes were less affected than the stands in valleys.

The vegetation types highly differed in disease extent. In general, the solitaires and scree forests were significantly less damaged than mixed ash-alder forests and riparian stands. The smaller stands were less affected than the more extended, the stands separated by canopies of other forests were less damaged than comparable vegetation in open places and stands with higher humidity (riparian stands and mixed ash-alder forests) were more damaged than those without water.

The outcomes clearly support the possibility of development and usefulness of appropriate forest and landscape management of the disease.

Key words: ash dieback; common ash; invasion; landscape; environmental factors; air humidity;

1 Introduction

Alien fungal pathogens have become a major threat to biodiversity and ecosystems worldwide (Santini et al., 2013). The increase in the number of invasive forest pathogens is due to human activity, especially because of the current emphasis on economic output (Desprez-Loustau 2009, Pautasso 2013) and global trade, which has exploded into a high-volume industry that facilitates the movement of pathogens around the globe (Brasier, 2008; Westphal, et al. 2008; Santini et al., 2013). This process is accompanied by the contemporary overtaking of international plant biosecurity protocols that have become outmoded, flawed, institutionalised, and too ineffectual (Brasier, 2008). Once established, exotic pathogens are usually difficult to eradicate in natural ecosystems (Brasier, 2008) and responding to exotic tree pathogens represents a real challenge for sustainable land use and rural economies (Pautasso, 2013). The development of successful control strategies requires a thorough knowledge of the biology, epidemiology, and pathways of the spread of each target organism (Sakai et al., 2001). The possibilities to fight the invasive pathogens are also complicated by the temporal lag in recognising that a new disease has appeared (Pautasso, 2013) as well as the incomprehension of the disease by responsible local authorities and governments, etc.

In Europe, alien fungal and fungal-like pathogens are the main cause of emerging infectious diseases in forest trees. The risk of serious genetic depletion as a result of repeated tree loss and offspring reduction is significant for many forest tree populations (Santini et al., 2013). For example, in the case of *Fraxinus excelsior*, most native trees are highly susceptible to the invasion of *Hymenoscyphus fraxineus* *Hymenoscyphus fraxineus* (T. Kowalski) Baral, Queloz, Hosoya, and only approximately 1% have the potential to produce offspring with an expected crown damage of <10% under the present disease pressure (Kjaer et al. 2012). The collapse of many European populations and ecosystems in which the dominating or keystone species is *F. excelsior* is repeatedly considered to be a possible consequence of pathogen invasion (e.g., McKinney et al., 2011, 2014; Pliūra et al., 2014).

Many healthy or affected ash stands are timbered in Denmark (Kjær et al. 2012; McKinney et al. 2014), the Czech Republic (Forests of the Czech Republic, State Enterprise) and apparently in other European countries. Artificial re-establishing of ash stands is not recommended due to the high probability of ash dieback (Pliūra et al., 2014). The production of ash material in nurseries has significantly decreased due to the high losses caused by ash dieback and the small amount of interest expressed by potential customers (The Forest Nursery Association of the Czech Republic, 2014). These events could also strengthen the process of the genetic erosion of the species if they persist for a long time.

Genetic diversity is a major element of biodiversity (CBD, 2002); it is the basis for adaptation and supports the correct functioning of the ecosystem (MEA, 2005). The value of adaptive genetic variation has been recognised in forest management, conservation biology and conservation genetics (Schüler et al. 2013). Among others, the potential use of the genetic diversity of tree hosts as a buffer against new diseases including ash dieback has become highly relevant (Kjær et al., 2012). The impact of ash dieback affects the genetic diversity in common ash, and its current genetic diversity might be insufficient for further physiological and genetic adaptation and sustainability of its populations (Pliūra et al. 2014). The future of common ash is unclear and adequate gene conservation and management strategies are still unknown and need to be elaborated (Pliūra et al. 2014).

The repeatedly detected genetically based resistance of common ash to *H. fraxineus* (e.g., Pliūra et al. 2011, 2014; McKinney et al. 2012, 2014; Stener 2013; Enderle et al. 2015) has led to the general recommendation of selecting and preserving the most resistant genotypes for use in subsequent resistant breeding. The first orchards to preserve the more

resistant genotypes were established in several European countries (McKinney et al. 2014; Pliūra et al., 2014).

However, the selection and preservation of promising genotypes and subsequent resistance breeding potentially pose at least three risks. The first is that thorough screening of large areas, such as the European continent or other large countries, is unrealistic and impossible. In addition, many promising genotypes may not be recognised even during screening. The practice of relevant Forest Authorities and forest owners described by Kjær et al. (2012) as well as those practices undoubtedly performed in other countries will inevitably lead to irrecoverable loss in a very short time.

The second risk involves the potential inbreeding depression and loss of genetic diversity (Keller and Waller, 2002; Angeloni et al. 2011) in the common ash population as a consequence of contemporary forest practices (Kjær et al. 2012). Due to the selection of only a small proportion of promising genotypes (undoubtedly the recommended effective N_e size = 300–400 (McKinney et al., 2014) would not be respected due to several objective reasons in many countries) as well as their propagation, breeding and especially expectable massive commercial distribution of a limited number of very resistant genotypes originating from resistance breeding and their following spontaneous spread and introgression.

The third potential risk originates from concentrating the large amount of different host genotypes in several orchards and implementing intensive breeding programmes. The possibility of this threat could be demonstrated on broadly known situations in poplar cultivation. Rust caused by *Melampsora larici-populina* is the most widespread and frequently occurring disease in poplars (Pei et al., 2007). Massive resistance breeding programmes have led to the rapid evolvement of pathogen virulence markers in the cultivated stands during the past 30 years, the infection of number of poplar clones selected for complete resistance to *M. larici-populina* after the development of virulent isolates of the fungus, and increase in evolution rate (Pinon and Frey 1997, Frey et al. 2005) and diversity richness of the pathogen. However, the genetic distances between populations from cultivated and wild stands were low, suggesting it is unlikely that there is a strong barrier between populations of cultivated and wild stands (Frey et al. 2005); thus, the genetic introgression from the rust population of cultivated stands is possible and potentially hazardous. Although the resistance against *H. fraxineus* is rather quantitative (McKinney et al. 2014), the similar risk in the case of the pathosystem *F. excelsior/H. fraxineus* cannot be undervalued because of the heterothallic mating system and strictly outbreeding reproductive mode, absence of a clonal spread, detected high genotypic diversity, continuous genetic exchange among distant populations via airborne spread (Gross et al., 2014a,b; Burokiene et al., 2015) and, of course, different generation times of the host and its pathogen. Moreover, as noted by Burokiene et al. (2015), the rather special genetic population structure of *H. fraxineus* may make it difficult to develop an effective biological control.

As presented above, the reliance on resistance breeding as the only or dominant way to resolve the ash dieback invasion problem could induce unwanted and unpredictable consequences; this solution should be considered as only a part of a more complex strategy. Unfortunately, recent attention of European researchers has primarily focused on the investigation of the resistance of the host (Pliūra et al. 2011, 2014; Kiristits and Freinschlag, 2012; Metzler et al., 2012; McKinney et al. 2012, 2014; Enderle et al. 2013, 2015; Stener 2013; Lobo et al., 2015) and not on epidemiology. However, a successful strategy must include thorough knowledge of the biology and epidemiology (Sakai et al., 2001), especially a deep analysis of the real impact of the disease in the landscape. The distribution and impact of many airborne pathogens is significantly determined by climatic conditions – primarily by moisture and temperature (Kowalski, 2013). Recently, this relationship was verified in *Phytophthora ramorum* (Davidson et al., 2005; Meentemeyer et al., 2008), and it is hypothesised

this relationship will also be present in the case of the *H. fraxineus* invasion. The presented study aims to fill this important gap in ash dieback investigation and is primarily concerned with identifying the potential influence of the vegetation type and geomorphology as well as environmental, silvicultural and other factors on disease impact.

2 Methods

2.1. Study area and plot selection

The field work was conducted in Lusatian Mts. Protected Landscape Area covering ca 235 km² in north Bohemia (the Czech Republic) near boundary with Saxony (Germany) in altitudes 312 – 793 m a.s.l. in the area between 50° 46' – 50° 55' N and 14° 25' – 14° 52' E. The Lusatian Mts. are characteristic by great shape variety, which was one of the main reason for choice of this area. Different relief shapes are given by varied geological composition. The area is primarily created by Cretaceous sandstone floes intruding a broad scale of different Tertiary igneous volcanic bodies. Only a smaller part in north border is created by granitoids of the Lusatian Plutonic body. Morphologically is the area created by main flat and hilly main ridge in northwest, surrounded by many neo-volcanic knots divided by many deep tectonically based valleys. The western part is characteristic due to erosion denudating relief in ashlar sandstones, deep canonyous stream valleys and separated igneous domes. The landscape is characteristic due to high proportion of forests (65 %), meadows, pastures and scattered old rural settlement with high rate of scattered greenery. Common ash is relatively frequent tree in the landscape. It is represented in scree forests on slopes of volcanic intrusions, in slopes of deep valleys and characteristically in mixed ash-alder forests in bottoms of valleys. In rural landscape, the tree is frequent in riparian stands along small watercourses and very frequent in shelterbelts. Moreover, common ash as an indigenous German sacred tree was frequently planted by the former German population. Many of these trees still grow and bear many local ash micropopulations in the landscape because of known regeneration potential due to high density and vitality of ash seedlings (Wardle, 1958; Dobrowolska et al. 2008). The pathogen invaded the area approx. 9 years ago and its population is more or less stabilised.

The investigation was made during 2011–2013. The four particular subareas covering ca 20 km² were selected in different parts of PLA with respecting the geomorphological and vegetation variability of the landscape and the presence of common ash. Particular subareas were divided in 20 squares (1 km²) and only one research plot (round plot with d=50 m) was determined inside each square. In total, 80 research plots were selected and the coordinates of their centres were read in WGS-84 system (Fig. 1). The plots were selected with emphasis on the clear and unquestionable classification of vegetation with ash presented in these plots into 5 functionally and ecologically different vegetation types – solitaires, scattered plantations, riparian stands, scree forests and mixed ash-alder forests (see below). The distance between neighbouring plots was at least 500 m to avoid the reciprocal influencing of plots, but usually the distance was 700–800m. From the same reason, the rule that selected plots in neighbouring squares must belong to different vegetation types was respected as far as possible. Particular vegetation types were equally distributed in set of plots within each subarea with simultaneous respecting of altitudinal gradient.

As vegetation types were the following. Solitaires were the isolated trees (at least 30 m from other tree) in open rural landscape (meadows, scattered settlement etc.) usually with high landscape value. Scattered plantations were the groups of trees, alleys, shelterbelts with total canopy between ca 10–30% in the plot. Riparian stands were the continuous tree lineages

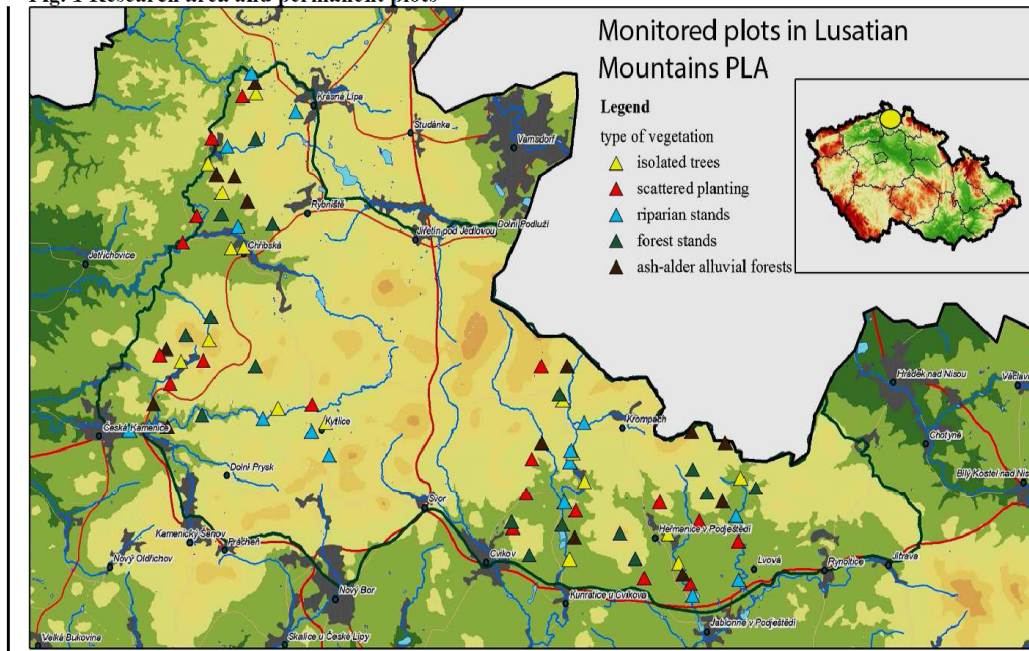
surrounding watercourses in open rural landscape with total canopy closure usually up to 30%. Mixed ash-alder forests grown in alluvia in forest environment with total canopy at least 80%. Scree forests were the forests on slopes (usually with presence of scree) with canopy at least 80%.

2.2. Data collection

The field investigation was carried out between 1st. July and 31st. August in 2011 and in 2013. The field works were terminated before the first premature leaf fall caused by ash dieback usually starting in the area in half of September. The all ash trees including those in shrub were identified and marked. In total, there were identified 1045 ash trees.

The variables describing the disease, host and environmental factors were identified in each tree (Tab. 1). In total, 31 variables were ascertained in each plot. The first one was rate of ash dieback as independent variable describing the disease impact. Next 10 other independent variables were describing presence and characteristics of the host and remaining 23 independent variables described the environment. If possible, the measured variables were acquired with respect to International Co-operative Programme on Assessment and Monitoring of Air Pollution Effects on Forest (Eichhorn et al., 2010) unifying the method of collection of data from forest environment.

Fig. 1 Research area and permanent plots



2.3. Variables

Morphometry

The height of trees, height of tree crowns and crown putting-on value were measured with use of rangefinder Nikon Forestry 550. The diameter of the crown was measured twice in perpendicular diameters and the values averaged. Projection of ash crown area was counted with the measured diameters. Area of particular ash trees were also summarised in the total ash crown area in the plots.

The crown volume of trees is important variable describing the amount of accessible substrate. Crown volumes were counted with use of measurements of crown height and two semidiameters measured perpendicularly according following formula. The crown shape was due to its monaxial growth habit (Wardle, 1961) viewed in a simplified way as ellipsoidal. Volume of crowns was counted as $V = \pi/6 * v * r_1 * r_2$. The volume of ash coppice was measured in a simplified way as volume of cuboid as $V = v * r_1 * r_2$. The total crown volume of ash in particular plots was counted as the sum of volumes of trees in them.

Description of the ash dieback extent and other diseases

Presence of characteristic ash dieback symptoms (Kowalski, 2006; Kowalski and Holdenrieder 2009) in crowns was verified with binoculars. The rate of withered crown was identified with use of method “foliage transparency” according to ICP Forest 2010 (Eichhorn et al., 2010) describing the amount of light penetrating through the crown was used. The work of Smitley (2008) was used as the calibration. The rate of dead crown volume higher than 10% was accounted in tens of per cent. The values <10% were in more detail divided into 5% and 2% values.

With use of dendrometrical data, the total volume of necrotised crowns of particular trees was identified. The total real necrotised volume of crowns in plots was found out by summation and the total rate of necrotised volume of crowns in plots was counted with help of the total crown volume in plots.

The distance from the nearest affected ash tree was directly measured or in the case of long distances it was determined with use of GIS. The rate of ash dieback was determined in the nearest host in way described above.

The other damages expressing by crown damage caused by pathogens (e.g., *Pseudomonas savastanoi*, *Nectria* sp., *Armillaria* sp.), pests (*Hylesinus fraxini*, *Eriophyes fraxinivorus*), withering caused by natural factors as canopy closure, frost damage, senescence, mechanical damage and breaking of branches were registered and evaluated in presence/absence separately. Moreover, mechanical damages caused by deer, human and by objects floating by water in riparian stands were registered and evaluated in the same way. *Armillaria* sp. was registered on the basis of presence of basidiomata and/or rhizomorphs; rhizomorphs were randomly determined by molecular way (Antonín et al., 2009). Because of the mycelium of the pathogen could be extended in great areas (Burnett, 2003) and damage of particular trees couldn't be apparent, the presence of this pathogen was also evaluated at the plot level.

The damage of all plots and ash trees was evaluated by the first author to avoid the potential mistake caused by different subjective evaluation.

Description of the environment

The total canopy closure of tree layer and the share of ash trees in it were determined in plots. The suppression of ash tree by crowns of surrounding trees was described in 9 categories describing closure of periphery by other trees (from 0 to 8): 0, <90%, 90–180%, 180–270%, >270% of periphery, and in combination with closure of the tree top: <90% + top, 90–180% + top, 180–270% + top, >270% + top.

The presence of shrub and unmowed herbaceous vegetation under crown of the host (as presence/absence) and distance from water source and roads (in m) were described. Some of these factors affect air humidity (Geiger et al., 2009) and they could have the influence on the pathogen sporulation.



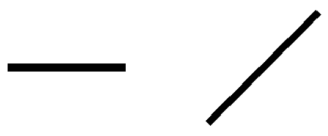



The hydric series of stands were evaluated in three categories: normal, moisten, wet-flowing according to Průša (2001). The values of average year temperature were obtained from Tolasz et al. (2007).

Description of altitude and geomorphology

The altitude and the slope were measured in the centre of the plots. The aspect was evaluated in octants N (337.6–22.5°), NE (22.6–67.5°), E (67.6–112.5°), SE (112.6–157.5°), S (157.6–202.5°), SW (202.6–247.5°), W (247.6–292.5) and NW (292.6–337.5°). The landscape forms in research plots were evaluated in a simplified way in categories top shape, convex slope, homogeneous slope, concave slope, flat shapes in valleys and concave shapes in valleys (Veverka and Zimová, 2008).

The variables describing detail terrain morphology were acquired from Digital Terrain Model of the Czech Republic (DMR 4G, Czech Office for Surveying, Mapping and Cadastre, Prague) with use of known coordinates of plots and their area. DMR represents a picture of natural or by human activity modified terrain surface in digital form as heights of discrete points in a regular grid (5×5m) with total standard error of 0.3 m of height in the bare terrain and 1 m in forested terrain. The zonal statistics with grid 5×5m was used for the calculation slope, vertical heterogeneity and standard deviations of slope and topographic position index (TPI). The differences in terrain morphology described by different values of these variables are simplified in Fig. 2.

Fig. 2. Differences in terrain morphology described by different values of vertical heterogeneity, SD of slope and SD of TPI, schematized

	low value	high value
vertical heterogeneity		
SD of slope		
SD of TPI		

Air humidity

In 2012, 50 plots were selected for investigation of air humidity with respect to overall variability of vegetation, geomorphology, altitude, aspect, slope, etc. and in variability in disease extent in particular plots. The air humidity was measured with devices Datalogger Minikin THi (EMS, Brno). The devices were installed in centres of research plots 4.5 m above the ground at the north side of tree trunks. The devices measured the air humidity in 5min intervals and recorded the average values in 15min intervals. The air humidity was measured during 1st July to 31st August – i.e. in the period of main ascospore spread (Timmerman et al. 2011). The measurements were made in 2012 and repeated in 2013. The

sum of days with air humidity >95% and average air humidity were selected as useful variables.

2.4. Statistical evaluation

The statistical evaluation was made with use of statistical software R (R Core Team, 2015). The preliminary checks of the data revealed strong dependence between some variables. In the case of quantitative variables the correlation matrix was calculated, in the case of categorical variables chi-squared tests of independence (Anděl, 1998) were carried out. From each group of strongly dependent variables was then selected only one to the next processing.

The experimental plots were firstly divided into five vegetation types: solitary occurrence, scattered plantation, riparian stand, forest stand and alluvial ash-alder mixed forest. This field division was verified with use of linear discriminant analysis (Rencher, 2002). The following characteristics were used as discriminating variables: canopy of tree layer, the proportion of ash, distance to water source, altitude, terrain slope, SD of slope, vertical heterogeneity, TPI, SD of TPI and average temperature.

The dependence between ash dieback and variables characterizing the vegetation, environment and geomorphology of the plots was modeled by general linear model where y_i

$$y_i = \sum_{j=1}^m \beta_j x_{ij} + \varepsilon_i, \quad (1)$$

is the percentage of crown damage of i^{th} tree, x_{ij} is the value of the j^{th} independent variable for the i^{th} tree, β_j are the corresponding coefficients of the linear model and ε_i are residuals. The model included 27 independent variables (Table 1). The parameters of model (1) were estimated using lm function. The set of statistically significant variables was determined by stepwise regression, the minimization of Akaike information criterion was used as an optimization criterion. In (2), n is the number of surveyed trees, s^2 is the residual variance

$$A = n (1 + \log(2\pi s^2)) + 2(r + 1), \quad (2)$$

and r is the number of model parameters. The assumptions of the general linear model, namely normality and independence of residuals were verified using the chi-square test Goodness and Durbin-Watson test respectively.

Table 1. The list of independent variables used in the model

	Categorical variables	Quantitative variables
	closure by surrounding trees	height
	<i>Eriophyes fraxinivora</i>	height of crown putting on
	<i>Armillaria</i> sp.	crown area
Tree level	<i>Nectria</i> sp.	distance to water
	<i>Hylesinus fraxini</i>	distance to road

	shrub layer non-mowed herbal layer lawn mechanical damage	
Plot level	<i>Armillaria</i> sp. aspect hydric series	total ash crown area rate of ash tree layer canopy distance to nearest host damage of nearest host altitude vertical heterogeneity slope SD of slope SD of TPI average temperature no. of days with air humidity >95% avg. air humidity

3 Outcomes

3.1. Basic model valid for the whole investigated area

Several explaining models were developed with the data collected from investigated trees in 50 plots in 2013; the most representative model is shown in Table 2. The model consisted of 12 conclusively contributing environmental variables and explained more than 27% of the disease variability. The variables positively affected concerning the disease impact in particular trees included: the presence of *Armillaria* sp., rate of crown closure by surrounding trees, north aspect, TPI, vertical heterogeneity, rate of ash canopy in the plot and rate of neighbour's damage. The variables negatively affected included: aspects other than north in general, presence of *Eriophyes fraxinivorus*, SD of slope and slope, tree height and rate of tree layer canopy in the plot. The variable rate of the tree layer canopy should be interpreted as a function of the canopy of other trees than ash in this model.

Table 2. The general model explaining the impact of environmental factors on ash dieback in research plots. Significance codes: * (0.001), ** (0.01), * (0.05), (0.1)**

Residual SE: 22.35 on 689 DF, Multiple R²: 0.272, Adjusted R²: 0.2456, F-statistic: 10.3 on 25 and 689 DF, p-value: < 2.2e-16

Variable	Estimate	SE	t value	Pr(> t)
(Intercept)	35.820052	8.603805	4.163	3.53e-05 ***
tree height	-0.450464	0.213231	-2.113	0.034997 *
closure0	7.591187	5.249111	1.446	0.148580
closure1	6.686544	4.560587	1.466	0.143061
closure2	11.716258	5.412061	2.165	0.030742 *
closure3	13.241474	5.794680	2.285	0.022609 *
closure4	23.451513	11.219950	2.090	0.036969 *
closure5	25.839263	22.854329	1.131	0.258614
closure6	13.434001	12.104907	1.110	0.267473
closure8	22.767572	6.339516	3.591	0.000352 ***
Eriophyes fraxinivorus	-13.087075	4.741114	-2.760	0.005928 **
Armillariahost	57.565604	6.215156	9.262	< 2e-16 ***
ash area	0.003544	0.001062	3.336	0.000896 ***
tree layer area	-0.118412	0.054577	-2.170	0.030376 *
neighbour's dieback	0.214544	0.066476	3.227	0.001308 **
vert. heterogeneity	4.155435	1.047724	3.966	8.07e-05 ***
aspect NE	-22.546761	5.598788	-4.027	6.27e-05 ***
aspect E	-25.253767	9.203292	-2.744	0.006228 **
aspect SE	-8.723554	5.406887	-1.613	0.107112
aspect S	-17.288076	5.406745	-3.198	0.001450 **
aspect SW	-7.218586	5.550930	-1.300	0.193889
aspect W	-16.505272	5.293449	-3.118	0.001896 **
aspect NW	-21.446960	6.294277	-3.407	0.000694 ***
slope	-1.917594	0.362729	-5.287	1.67e-07 ***
slope SD	-3.148122	0.876492	-3.592	0.000352 ***
TPI SD	15.626143	4.396270	3.554	0.000405 ***

3.2. Models valid for particular vegetation types

Because common ash was distributed throughout diverse vegetation types (scree- and mixed ash-alder forests, riparian stands, shelterbelts and solitaires) within the area affected by scales of identical or diverse sets of environmental variables (for instance, tree layer canopy attained quite different values in these vegetation types, or *Armillaria cepistipes* was frequently distributed in forest vegetation types and not in rural landscape, etc.), the importance of analysis of particular vegetation types seemed to be helpful.

In the first step, the correctness of the classification of particular research plots into vegetation types was verified by discrimination analysis (DA) with the use of a set of 10 environmental variables conventionally discriminating the abovementioned vegetation types. These variables included the tree canopy, distance from watercourse, etc., and were previously used in the development of the general model of ash dieback (Table 2). The outcomes showed 90% agreement of field and DA classifications (Table 3). Only 5 plots were classified in different (but neighbouring) categories by these two approaches. Thus, the field classification of the plots could be respected in the following analyses.

Table 3. Verification of the classification of research plots into vegetation types according to environmental variables. Vegetation types: A (solitaires), B (scattered plantations, alleys), C (riparian stands), D (scree forests), E (ash-alder mixed forests); in bold: identical determinations, in italics: disagreements, classified according to DA in the table

		DA classification (vegetation types)				
		A	B	C	D	E
Field classification (vegetation types)	A	9	<i>1</i>	-	-	-
	B	<i>1</i>	6	<i>2</i>	-	-
	C	-	-	11	-	-
	D	-	-	-	7	<i>1</i>
	E	-	-	-	-	12

As these vegetation types are unique and distinguishable entities with different roles in the landscape and are determined by different characteristics, it can be assumed that the disease development process could be at least partially driven by different scenarios. Thus, it could be possible to develop a set of ash dieback models valid for particular vegetation types.

The particular developed models explained ca 28–46(–94)% of the variability in ash impact and consisted of different variables with a conclusive influence. Several factors were shared by the diverse vegetation types – for example, the rate of ash, neighbour’s dieback, distance from water, *Armillaria* sp. infection, etc. However, several factors were specific and played an important role in particular vegetation type – the exposition, slope, or presence of the shrub layer or unmowed grass cover (Table 4).

The model for solitaire trees included the following variables with a positive influence on disease impact: unmowed grass area, SD of TPI, shrub layer area, mechanical damage, level of neighbour’s dieback and host crown area. The impact of the pathogen was negatively affected by contemporary *Nectria* sp. infection and SD of slope.

The model for scattered plantations included the following variables with a positive influence on disease impact: *Hylesinus* spp., level of neighbour’s dieback and rate of ash in the tree stand. The impact of the pathogen was negatively affected by the contemporary presence of *Eriophyes fraxinivorus* and area of ash.

The model for riparian stands was developed using three variables that had a conclusive influence on disease impact: crown closure produced a positive effect on the disease, and water distance and slope produced negative effects.

The model for scree forests included the following variables that produced a positive influence on disease impact: *Armillaria* sp. infection, level of neighbour’s dieback and ash area in the stand. The variables of the tree layer area, tree height, water distance and distance of the nearest host produced negative effects. The variable tree layer area should be interpreted as a function of the canopy of other trees than ash in this model.

Table 4. The models explaining the impact of environmental factors on ash dieback in particular vegetation types. Vegetation types: A (solitaires), B (scattered plantations, alleys), C (riparian stands), D (scree forests), E (ash-alder mixed forests); Significance codes: * (0.001), ** (0.01), * (0.05), (0.1). The significant at 0.1 probability level are presented.**

A Residual SE: 1.416 on 6 DF, multiple R ² : 0.9381, adjusted R ² : 0.8556, F-statistic: 11.37 on 8 and 6 DF, p-value: 0.004109				
	Estimate	SE	t value	Pr(> t)
(Intercept)	-47.605794	6.537657	-7.282	0.000342 ***
host crown area	0.031292	0.005409	5.785	0.001167 **
neighbour’s dieback	0.537518	0.065942	8.151	0.000183 ***
slope SD	-1.665310	0.670927	-2.482	0.047669 *
TPI SD	26.375115	6.690913	3.942	0.007608 **
unmowed grass area	37.653451	4.591544	8.201	0.000177 ***

Nectria sp.	-25.852736	3.252595	-7.948	0.000211 ***
mechanical damage	9.249336	1.703787	5.429	0.001619 **
shrub layer area	25.042501	3.547024	7.060	0.000404 ***
B Residual SE: 13.9 on 93 DF, multiple R ² : 0.4575, adjusted R ² : 0.3871, F-statistic: 6.528 on 12 and 93 DF, p-value: 2.575e-08				
	Estimate	SE	t value	Pr(> t)
(Intercept)	-7.779289	8.200617	-0.949	0.34527
tree height	0.681720	0.390555	1.746	0.08420 .
Eriophyes fraxinivorus	-9.378699	4.348436	-2.157	0.03360 *
Hylesinus fraxini	92.448479	14.082796	6.565	2.94e-09 ***
mechanical damage	9.609854	5.532557	1.737	0.08570 .
ash area	-0.012397	0.004939	-2.510	0.01379 *
rate of ash	0.193699	0.093629	2.069	0.04134 *
neighbour's dieback	0.586688	0.172863	3.394	0.00101 **
C Residual SE: 22.52 on 147 DF, multiple R ² : 0.2776, adjusted R ² : 0.2235, F-statistic: 5.134 on 11 and 147 DF, p-value: 8.698e-07				
	Estimate	SE	t value	Pr(> t)
(Intercept)	5.26862	15.84313	0.333	0.73995
closure 3	56.97164	13.13003	4.339	2.65e-05 ***
closure 6	40.53671	24.32515	1.666	0.09775 .
water distance	-0.81962	0.33181	-2.470	0.01465 *
slope	-4.23037	1.59369	-2.654	0.00882 **
altitude	0.10037	0.05412	1.855	0.06562 .
vert. heterogeneity	2.17593	1.28261	1.696	0.09191 .
D Residual SE: 16.23 on 153 DF, multiple R ² : 0.3863, adjusted R ² : 0.3582, F-statistic: 13.76 on 7 and 153 DF, p-value: 9.598e-14				
	Estimate	SE	t value	Pr(> t)
(Intercept)	247.169533	48.187876	5.129	8.69e-07 ***
tree height	-1.421751	0.287022	-4.953	1.91e-06 ***
water distance	-0.394177	0.058144	-6.779	2.46e-10 ***
ash area	0.004552	0.001037	4.390	2.10e-05 ***
Armillaria host	94.173347	16.901485	5.572	1.11e-07 ***
neighbour's dieback	1.459365	0.330682	4.413	1.91e-05 ***
tree layer area	-1.549382	0.359737	-4.307	2.95e-05 ***
nearest host's distance	-0.036207	0.015192	-2.383	0.0184 *
E Residual SE: 24.58 on 258 DF, multiple R ² : 0.351, adjusted R ² : 0.3132, F-statistic: 9.301 on 15 and 258 DF, p-value: 2.2e-16				
	Estimate	SE	t value	Pr(> t)
(Intercept)	-59.39759	29.65027	-2.003	0.046194 *
tree height	-1.80658	0.35651	-5.067	7.69e-07 ***
water distance	-0.27860	0.13871	-2.008	0.045639 *
Armillaria host	60.14463	7.62150	7.891	8.53e-14 ***
Armillaria stand	37.24110	9.76674	3.813	0.000172 ***
road distance	0.50079	0.25955	1.929	0.054775 .
shrub layer area	24.32635	9.70841	2.506	0.012838 *
rate of ash	0.99664	0.29191	3.414	0.000743 ***
nearest host's distance	0.08580	0.03192	2.688	0.007662 **
aspect SE	53.85787	18.42622	2.923	0.003776 **
aspect S	39.03138	18.77466	2.079	0.038611 *
aspect SW	38.82780	18.66633	2.080	0.038504 *

The model for mixed ash-alder forests included the following variables that produced a negative influence on disease impact: *Armillaria* sp. infection of the host; *Armillaria* sp. infection of other hosts in the stand; presence of the shrub layer, southeast, south and southwest aspects; rate of ash in the stand; distance to other nearby hosts and most likely

distance from the road. The ash dieback was negatively affected by contemporary presence of *Eriophyes fraxinivorus*, mechanical damage, tree height and distance from water.

The overview of role of particular factors in general model and in particular vegetation types is summarised in Table 5.

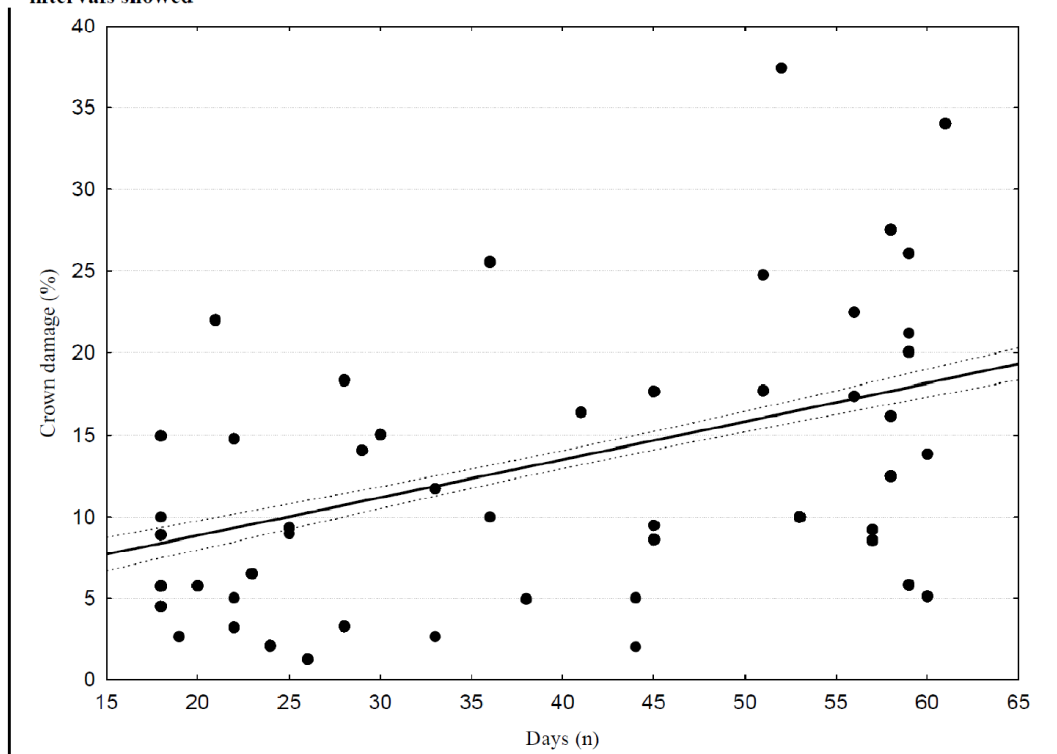
Table 5. Summary of common and particular models explaining the impact of environmental factors on ash dieback with explanation power of particular models. Vegetation types: general (model for the whole investigated area), A (solitaires), B (scattered plantations, alleys), C (riparian stands), D (scree forests), E (ash-alder mixed forests), + (positive) and – (negative) influence on the disease impact

	general	A	B	C	D	E
tree height	-				-	-
ash area	+		-		+	
host crown area		+				
rate of ash			+		+	+
tree layer area	-				+	
neighbour's dieback	+	+	+		+	
nearest host's distance					-	+
closure	+			+		
water distance				-	-	-
<i>Eriophyes fraxinivorus</i>	-		-			
<i>Armillaria</i> host	+				+	+
<i>Armillaria</i> stand						+
<i>Nectria</i> sp.		-				
<i>Hylesinus fraxini</i>	+		+			
mechanical damage		+				
vert. heterogeneity	+					
aspect N	+					
aspect SE–SW						+
slope	-			-		
slope SD	-	-				
TPISD	+	+				
shrub layer		+				+
unmowed grass area		+				
Multiple R-squared	0.272	0.9381	0.4572	0.2776	0.3868	0.351

3.3. Influence of air humidity

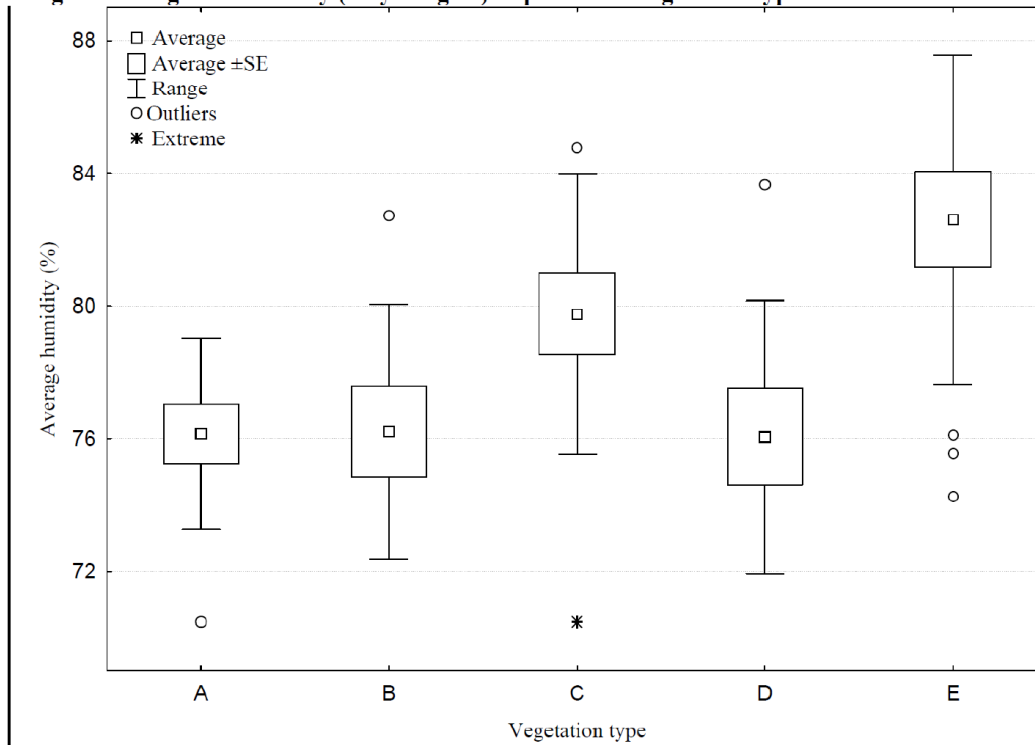
As previously stated, stands with accessible water were more damaged than those without water. In addition, the spread and impact of many airborne fungal pathogens is affected by climatic factors, especially by humidity. The conclusive regression ($r=0.45$, $p<0.0001$) of the rate of crown damage on the number of days with an air humidity $>95\%$ between 6–11 a.m. in the period of ascospore spread from July to August was identified in 2013 (Fig. 3).

Fig. 3. Regression of rate of crown damage on number of days with air humidity >95% between 06–11 a.m. in the period of ascospore spread from July to August 2012; regression curve and confidential intervals showed



The analysis showed that the particular vegetation types differ highly in air humidity, and the difference among vegetation types has a similar pattern (Fig. 4) in the rate of ash dieback (Table 7, Fig. 6). Subsequent analysis of the variance (ANOVA $F(4,738) = 116.48, p < 0.0001$) and post-hoc tests showed statistically convincing differences in air humidity among vegetation types (Fig. 4). Less air humidity was identified in scree forests (76.05%) solitaires (76.14%) and scattered plantations (76.21%). However, the average air humidity was significantly higher in riparian stands (79.76%) and in mixed ash-alder alluvial forests (82.60%). The air humidity was approximately 96% during night and morning hours and decreased to 62% during the day in dry vegetation types. In wet vegetation types, during the night and morning hours, it reached nearly 100% and decreased to 75% during the day.

Fig. 4. Average air humidity (July–August) in particular vegetation types



The humidity near the ground is greatly affected by vegetation type, canopy closure, presence of watercourses, terrain morphology (Geiger et al., 2009), and by many factors which were investigated in permanent plots. Thus, the knowledge of the potential role of ecological factors affecting air humidity, and thus indirectly the pathogen, could be useful in understanding the disease epidemiology and disease management.

The constructed GLM model revealed that the air humidity in permanent plots was convincingly affected by local environmental characteristics (TPI and SD of TPI, aspect, slope, altitude, presence of roads and distance from open water) and vegetation characteristics of particular plots (tree and shrub layers canopy, presence of unmowed herbaceous layer, height of the tree stand and height of putting on of tree crowns). The model explained 77% of the data variability (Tab. 6).

Table 6. The GLM model explaining the impact influence of environmental and stand characteristics on air humidity in the stand. Significance codes: *** (0.001), ** (0.01), * (0.05), only the variables with $p < 0.5$ presented

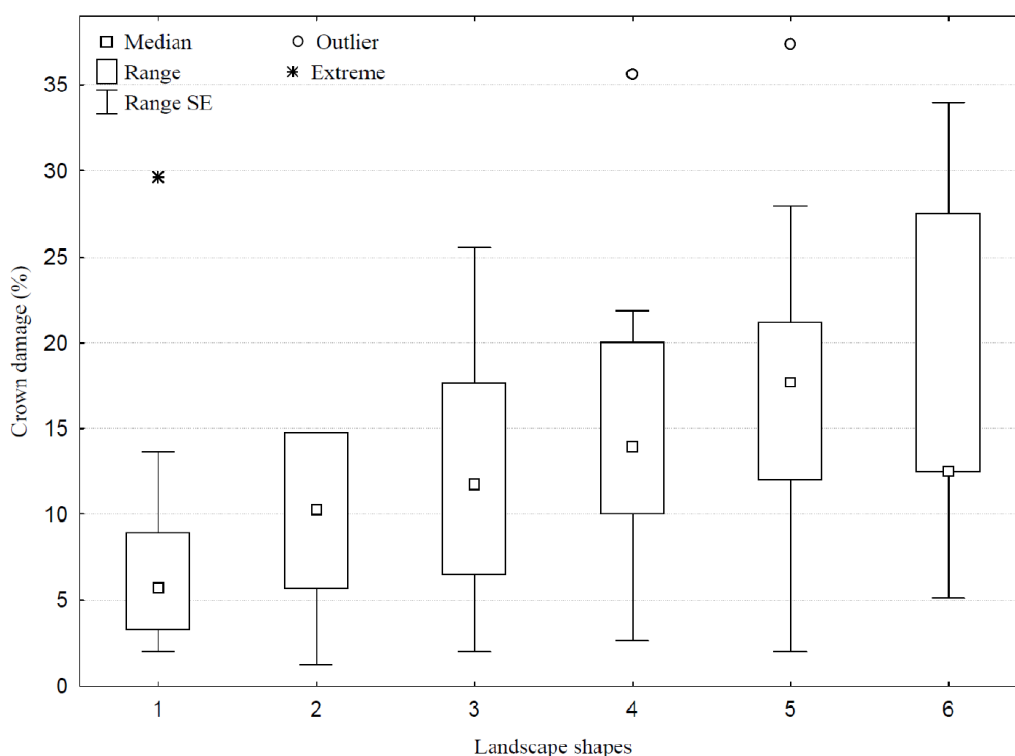
	Estimate	SE	t value	Pr(> t)
(Intercept)	21.995655	17.281869	1.273	0.203531
tree height	0.384055	0.081019	4.740	2.59e-06 ***
crown putting on	-0.439855	0.095334	-4.614	4.71e-06 ***
distance from water	-0.016026	0.006439	-2.489	0.013040 *
presence of road	-0.199179	0.035267	-5.648	2.37e-08 ***
shrub layer canopy	22.564133	2.956017	7.633	7.61e-14 ***
unmowed grass	20.383756	2.937059	6.940	9.02e-12 ***
tree layer canopy	0.144139	0.020073	7.181	1.79e-12 ***
altitude	-0.054861	0.010880	-5.042	5.88e-07 ***
aspect NW	-14.295720	1.995264	-7.165	2.00e-12 ***

slope SD	-2.681890	0.335035	-8.005	5.06e-15 ***
TPI5	-10.266709	1.389032	-7.391	4.21e-13 ***
TPI5 SD	18.242345	1.984920	9.190	< 2e-16 ***
temperature	3.804355	1.927880	1.973	0.048855 *

3.4. Influence of landscape geomorphology

As previously stated, several terrain characteristics affected the disease level – primarily, the slope, vertical heterogeneity, topography position index and their standard deviations. These variables can partially describe landscape forms at a larger scale. The rate of crown defoliation convincingly (ANOVA $F(5,1039) = 13.58, p < 0.0001$) differed according to these landscape shapes. The ash stands growing on mountaintops and convex slopes were less affected (7.69% and 10.02%, respectively) whereas the stands on homogeneous and concave slopes were more affected (12.37% and 17.02%, respectively). The stands in flat and concave valleys belong among the most affected stands (17.24% and 18.65% Fig. 5). The significant regression of rate of the disease on the altitude was also identified ($r = -36.54, p < 0.0001$). It was observed that the crown damage was significantly more prominent in lower altitudes than in higher altitudes. In lower altitudes (up to 400 m a.s.l.), the average crown defoliation was approximately 15.26%, whereas in higher altitudes (above 550 m a.s.l.), the damage was nearly halved (6.58).

Fig. 5. Rate of ash dieback in different landscape forms. 1 (top shape), 2 (convex slope), 3 (homogeneous slope), 4 (concave slope), 5 (flat shapes in valleys), and 6 (concave shapes in valleys)



3.5. *Ash dieback in diverse vegetation types and its development in 2011 and 2013*

Because these particular vegetation types highly differ in their characteristics among each other and diverse sets of environmental factors influence their disease development, it should be hypothesised that they can also differ in disease level. As the disease comes into play, the affected trees and vegetation types can significantly differ in crown volume (as an accessible substrate for the pathogen development); thus, it would be useful to know the extent of the disease. The crown volumes, real volumes of damaged crowns and rate of diseased crowns are presented in Table 7. The real necrotised crown volume depended on the total volume of the accessible tissues of the host crown (regression analysis $r=0.52$; $p<0.0001$; 2013).

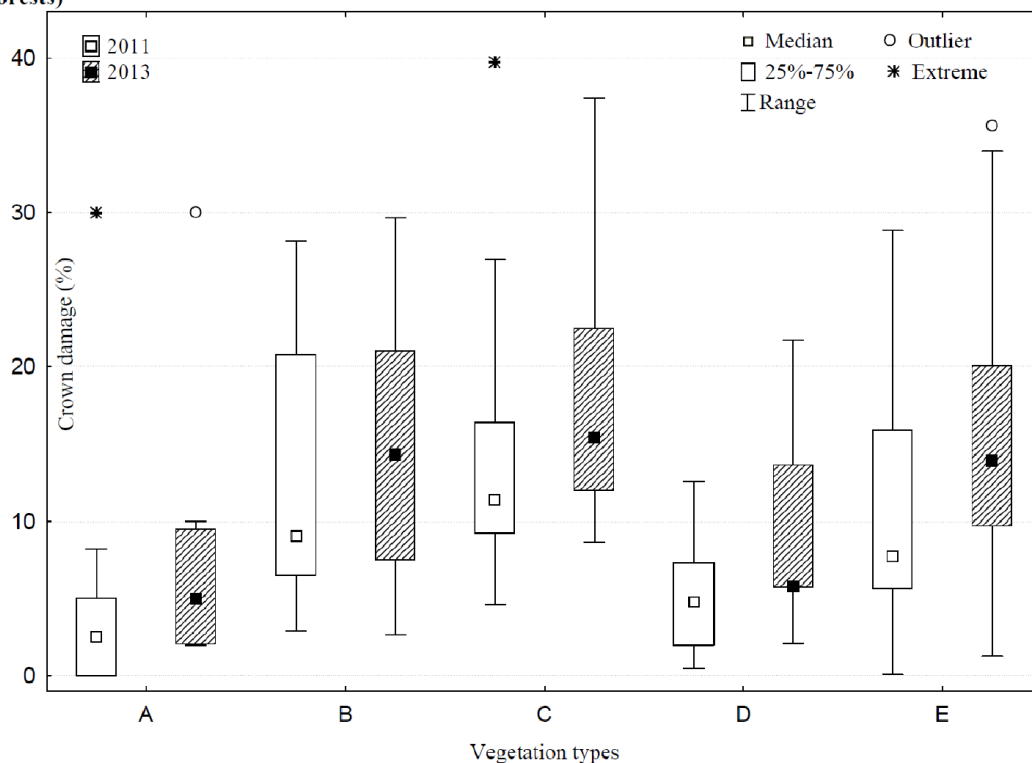
Table 7. Overview of crown volume of ash, volume of damaged crowns, rate of the disease in 2011 and 2013 and disease development between years of investigation. Vegetation types: A (solitaires), B (scattered plantations, alleys), C (riparian stands), D (scree forests), E (ash-alder mixed forests), SE: standard error

vegetation type (n)	crown volume		damage volume		disease rate		damage development 2011-2013 (%)
	2011 (m ³ , ±SE)	2013 (m ³ , ±SE)	2011 (m ³ , ±SE)	2013 (m ³ , ±SE)	2011 (%, ±SE)	2013 (%, ±SE)	
A(15)	2130,76	3576,12	56,05	208,88	4,47	6,94	+2,47
	1271,61	1809,29	54,70	154,53	7,48	7,05	
B (18)	5353,33	7429,91	614,76	947,76	12,44	13,84	+1,40
	4557,84	5472,38	676,91	932,55	7,65	7,85	
C (17)	8822,02	11298,47	1218,80	2009,12	14,63	17,9	+3,27
	5869,45	6630,92	1069,20	1370,78	8,96	7,92	
D (13)	16803,84	17722,81	502,91	1524,27	4,91	8,88	+3,97
	15826,70	13948,00	308,04	2190,46	3,68	5,91	
E (17)	14284,42	17448,74	1841,60	2924,40	10,76	16,11	+5,35
	9597,10	11384,89	2121,68	3007,12	8,05	9,62	
Average	9244,76	11330,99	880,89	1548,48	9,83	13,08	+3,29
	9818,49	10069,53	1284,06	2002,08	8,37	8,72	

The average damage in all investigated plots was 9.83% in 2011. The particular vegetation types were affected by the pathogen to different extents as follows: solitaires (the least affected type, 4.47%), scree forests (4.91%), mixed ash-alder forests (10.76%), scattered plantations (12.44%) and riparian stands (14.64%). The disease pattern was similar to that of 2013 (Fig. 6); however, the extent of the overall damage increased by 3.29%. The least damaged were the affected solitaires (6.94%) whereas the crown damage in the most affected riparian stands was 17.90%. Important deterioration was identified in mixed ash-alder forests in which the crown dieback increased by 5.35% to 16.11%, and this vegetation type became the second worst in the mutual comparison.

As previously stated, the average crown defoliation increased from 9.83% in 2011 to 13.08% in 2013; thus, the damage increased by 24.84% between 2011 and 2013. However, the real average volume of damaged crowns increased from 880.98 m³ in 2011 to 1548.48 m³ in 2013; thus, the real increase in damage was 43.11% during this period, which is connected to the increase in the total volume of crowns (Table 7) given by standard tree development.

Fig. 6. Development of extent of damage in particular vegetation types in 2011 and 2013. Vegetation types: A (solitaires), B (scattered plantations, alleys), C (riparian stands), D (scree forests), E (ash-alder mixed forests)



Analysis of the variance and post-hoc comparison showed that the vegetation types conclusively differed in crown volume, the volume of damaged crowns and the rate of ash dieback among vegetation types in 2011 and 2013 (Table 8). Analysis of crown volume revealed two homogeneous groups. The first had a lesser extent of crown volume composed of solitaires, scattered plantations and riparian stands, and both types of forest vegetation were in the second group. The outcomes were identical for both years. The analysis of the real volume of the damaged crowns revealed three homogeneous groups. The damage in the solitaires, scree forests and scattered plantations was less than in riparian stands and mixed ash-alder forests in 2011. In 2013, the situation slightly changed and the volume of damage in scree forests did not differ from that of riparian stands and mixed ash-alder forests. Three homogeneous groups were revealed when the rates of damaged crowns were compared. Less damage was identified in solitaires, scree forests and mixed ash-alder forests in 2011; the third homogeneous group consisted of ash-alder mixed forests, scattered plantations and riparian stands. The situation in 2013 was similar except the damage of mixed ash-alder forest was significantly worse (Tab. 8).

The outcomes could be summarised in the following way: 1) the total crown volume (amount of colonisable tissues) corresponded with the real volume of damaged crowns; 2) within vegetation types exposed in open landscapes, those with bigger crown volumes (scattered plantations and riparian stands) were relatively more damaged than those with smaller volumes (solitaires); 3) vegetation types enclosed in a canopy of surrounding forests were relatively less damaged than vegetation with comparable crown volumes in open landscapes (mixed ash-alder alluvial forests were less damaged than riparian stands and scree forests were less damaged than scattered plantations); 4) real damage was more prominent in stands with higher humidity (riparian stands and mixed ash-alder forests) than in stands without water.

Table 8. Outcomes of analyses of variances and post-hoc comparisons of total volume of ash crown, volume of damaged crowns and rate of disease in 2011 and 2013. Vegetation types: A (solitaires), B (scattered plantations, alleys), C (riparian stands), D (scree forests), E (ash-alder mixed forests)

	total crown volume	damage crown volume	disease rate
2011	A	A	A
	B	D	D
	C	B	E
	E	C	B
	D	E	C
2013	A	A	A
	B	B	D
	C	D	B
	E	C	E
	D	E	C

4. Discussion

Extensive investigation of the ash dieback impact was performed in 2011 and 2013 in five different vegetation types – solitaires, scattered plantations (for example, shelterbelts and alleys), riparian stands, scree and ash-alder mixed forests – in the Lusatian Mts. due to their highly heterogeneous, forest and pastoral, landscape. The rate of ash dieback was investigated in 80 permanent plots (ring plots with $r=50$ m) containing 1045 trees that were evaluated. The air humidity was measured by automatic dataloggers placed 4.5 m above ground in the centre of 50 research plots in the period of the main ascospore spread in July and August (Timmerman et al., 2011) in 2012. In total, 30 characteristics describing vegetation, environment, topography, and other factors that potentially affected the disease impact were evaluated.

Several GLM (R Plus) models explaining the impact of the pathogen were developed. The most successful model explained ca 27% of data variability and contained 12 conclusively important variables: the presence of *Armillaria* sp., rate of crown closure by surrounding trees, north aspect, TPI, vertical heterogeneity, rate of ash canopy in the plot and rate of neighbour's damage with a positive influence on the disease impact and aspects other than north in general, presence of *Eriophyes fraxinivorus*, SD of slope and slope, tree height and rate of tree layer canopy in the plot with a negative impact on the disease. Particular GLM models were developed for each vegetation type. These models were significantly different from each other and explained 28–46(–94)% of the data variability.

The first groups of variables that described the amount of ash in plots or its frequency (host crown area, ash area and rate of ash frequency) positively influenced the disease level in stands. These variables positively affect the possibility of colonization of the stands and, moreover, the amount of secondary inoculum (Mundt et al. 2011). Their influence was approximated, and it was in concordance with the fact that ash dieback epidemic requires a sufficient accumulation of susceptible host individuals (Schumacher, 2011; Gross et al., 2014) or, better, accessible biomass. Of course, this variable has a general validity and it was determined as important in development of SOD (Condeso and Meentemeyer, 2007) and in many other diseases.

The second group of variables described the distance and damage of the nearest host as a potential inoculum source. The distance of other susceptible hosts is highly important in disease development from the view of spreading potential of the pathogen, and it was determined to be fundamental in landscape models describing space patterns of important tree diseases including SOD (Meentemeyer et al. 2011, 2012).

The variables in the third group depict the terrain and stand characteristics thus they should be ascertained as indirect variables (Franklin, 1995). These variables affected, positive or negatively, microclimate including the air humidity (Bennie et al., 2008; Meentemeyer et al., 2012; Geiger et al., 2015; Pezzopane et al., 2015), which significantly influenced the ash dieback epidemiology (see below). Tree layer area, canopy closure, water distance, aspect, shrub and herbaceous layer and terrain morphology characteristics describing its coarseness (standard deviations of vertical heterogeneity and TPI) positively affected the air humidity near the ground in different ways, whereas slope and its standard deviation affected the humidity negatively (Geiger et al., 2015). Moreover, Schumacher (2011) stated that closed stands are more risky in disease development. Tree height affected the disease level negatively. As stated repeatedly, the younger and smaller trees were usually damaged in a larger extent (Kowalski and Holdenrieder, 2008; Schumacher, 2011; Kirisits and Freinschlag, 2012), because their crowns are closer to the source of inoculum on the ground. Moreover, the infection pressure is lower and leaf quality and/or microclimatic conditions are less suitable for infection in the crown of higher trees (Gross et al. 2014a).

Biological factors – coincidental attack by *Armillaria* spp. (mainly *A. cepistipes*) and *Hylesinus fraxini* produced a negative impact on disease progress and formed the fourth groups of factors. The strength of the ash dieback impact by *Armillaria* spp. infection has been repeatedly confirmed (Lygis et al., 2006; Skovsgaard et al., 2010; Bakys et al., 2011; Husson et al., 2012) and a similar effect of *H. fraxini* attack was also identified (Havrdová et al., in peer review).

The fifth group of influencing variables consists of coincidental attacks by *Nectria* sp., and *Eriophyes fraxinivorus*, which conclusively decreased the impact of ash dieback. The modes of their actions are unknown. However, it is very likely they can induce production of any secondary metabolites participating in defence mechanisms, which are also concurrently effective against ash dieback. In particular, the effect of *Eriophyes fraxinivorus* ($p < 0.01$ in the general disease model) could encourage the investigation of an effective biological control.

Lastly, the positive influence of mechanical damages (frost, etc.) on the extent of the ash dieback impact was confirmed in solitaires, most likely due to the reduced fitness of damaged trees.

The conclusive regression ($r=0.45$, $p < 0.0001$) of the rate of crown damage on the number of days with air humidity $>95\%$ between 6–11 a.m. in the period of ascospore spread from July to August was identified. This finding is in agreement with the finding of Schumacher (2011) who stated that the disease risk is highest for soils with very (all-season) wet conditions. Most likely, this fundamental finding could be connected with several features of pathogen biology and disease epidemiology. First, moist conditions favour plant infection by foliar fungal pathogens (Magarey et al. 2005). The humidity of the stand most likely affects the amount and period of formation and maturation of fruiting bodies on the previous year's petioles and leaflet veins in the litter lying on the ground. The humidity of droughts also can affect the amount of spore discharge as in the case of other foliar pathogens (Wulf 1994). The pathogen ascospores mainly spread during the morning hours (Timmerman et al., 2011; Hietala et al. 2013) when the air near the ground is warm and uprises. The spores are moved by this upward air flow and infect foliage. The ascospores are drought- and UV sensitive (Aylor, 2003; Gross et al., 2014a) because of their thin and hyaline wall. Finally,

after landing on foliage, the leaf wetness from the morning dew protects the germinant against desiccation (Hietala et al., 2013) which is similar to other leaf pathogens including *Apiogmonia veneta*, *Glomerella cingulata*, etc. (Sinclair and Lyon, 2005). Moreover, deep and moist soils create optimal conditions for the growth of ash (Wardle, 1958; Dobrowolska et al., 2008) which flourishes in these stands extremely well and produces an enormous amount of colonisable tissues, which are an excellent substrate for pathogen sporulation. Thus the tie between humidity and disease level could be partially caused by the feedback of the pathogen to the amount of accessible substrate.

Because the air humidity near the ground is highly affected by vegetation type, the canopy closure, presence of watercourses, terrain morphology etc. (Geiger et al., 2009), a GLM model explaining the variability of air humidity in research plots was developed. The model was extremely conclusive and explained the 77% variability of the data and consisted of TPI and SD of TPI, aspect, slope, altitude, presence of roads and distance from open water, presence of tree and shrub layers, presence of unmowed herbaceous layer, height of the tree stand and height of putting on of tree crowns. Moreover, the landscape form was identified as factor affecting the impact of the disease – the stands at mountain tops or convex slopes were less affected than the stands in flat or concave valleys.

The crown volumes of the all trees were measured, the relative crown damage was estimated and the real crown damage was calculated. The statistically important differences in the extent of the disease were identified among different vegetation types. In general, the solitaires and scree forests were significantly less damaged than mixed ash-alder forests and riparian stands. The damage of scattered plantations was not significantly different from the damage of other vegetation types. It was determined that the total crown volume (amount of colonisable tissues) corresponded with the real volume of damaged crowns. Among vegetation types exposed in open landscapes those with bigger crown volumes (scattered plantations and riparian stands) were relatively more damaged than those with smaller volumes (solitaires). Forest vegetation types enclosed in the canopy of other forests were relatively less damaged than vegetation with comparable crown volumes in open landscapes (riparian stands and scattered plantations). The real damage was more prominent in stands with higher humidity (riparian stands and mixed ash-alder forests) than in stands without water. The differences could be explained as follows. The most exposed stands (in open landscape) can be invaded firstly, where the stands with higher crown volumes (scattered plantations) can be affected in higher extent than solitaires. The higher amount of secondary inoculum can be created in stands with higher crown volumes thus their damage would be increased more quickly. Forest stands enclosed by continuous forests are at least partially preserved from infection by the closure, thus they can be infected later and in less extent. This is the reason of their contemporary relatively small damage. However, in regard to the potentially high production of secondary inoculum and higher air humidity in forest environment in these stands, their health stage could quickly worsen in near future. Vegetation types in wet conditions are more attacked by the pathogen due its relation to higher air humidity.

In investigation plots, the average crown defoliation increased from 9.83% in 2011 to 13.08% in 2013 i.e., the disease severity increased by 3.25%. A similar increase (from 11% to 16% within 2 years) was determined by Kessler et al. (2012) to be a moderate increase. However, the increase in real damage crown volume in the investigated plots was 43.11%, so it should be classified as relatively high. Moreover, the epidemic was in the first stages of disease curve in 2013 (Madden et al. 2007) and at the disease front (Gross et al., 2014a); thus, the main increase in losses is yet to come.

The outcome of this work clearly support the idea, that disease management based on utilisation of sources of resistance could be effectively facilitated by appropriate forest and landscape management of the disease, or at least by the management of particularly less sensitive vegetation types or in more heterogeneous areas. Of course, because the air humidity was determined to be one of the most important factors in disease epidemiology, the management of the disease would be more effective in regions that have a more continental climate than in west Europe which has an oceanic climate.

Conclusions

Over the last two decades, alien invasive fungus *Hymenoscyphus fraxineus* has taken the European continent rapidly and ash dieback has become a major problem. The disease is becoming a significant threat to biodiversity in forest ecosystems and the economic and aesthetic impacts are immense (McKinney et al. 2014). The extreme impact of the pathogen in different ecosystems throughout nearly the whole Europe gives an impression, that the management of the disease is hardly possible. Because a part of trees attacked by the pathogen showed a certain level of resistance, as confirmed many studies from several European countries (Pliūra et al. 2011, 2014; Kiristits and Freinschlag, 2012; Metzler et al., 2012; McKinney et al. 2012, 2014; Enderle et al. 2013, 2015; Stener 2013; Lobo et al., 2015), the attention of many plant pathologists became attached to investigation of disease resistance as the most promising or only one way in the disease management. However, overdone relying on the more resistant genotypes and following breeding could lead to unwanted consequences – strengthening of loss of genetic diversity or acceleration in pathogen evolution.

The presented extensive investigation of ash dieback impact in different rural vegetation types showed that the impact of this airborne disease is also determined by environmental factors and silvicultural characteristics. The air humidity was revealed as very important factor responsible for important part of variability in disease data. It was showed that air humidity is mainly determined by local environmental and silvicultural characteristics. Important environmental characteristics affecting the disease impact included vegetation type, density of ash in the stands, ash area, height of trees, shrub and herbal layers, canopy closure, aspect, slope, vertical heterogeneity, topographic position index, landscape forms, the distance and damage of nearest host, distance from water source, coincidental presence of other pathogens and pests, etc.

The presented study gives good chance to develop appropriate and useful management strategy of the disease in different ecosystems with ash and it could present valuable contribution to development of integrated management of the disease. However, the success of the future management strategy will be highly dependent on active and judicious approach by Forest Authorities and owners, Nature Agencies, local administrations, etc.

Acknowledgement

We would like thank to Alexandr Hrozek (Lusatian Mountains PLA) for great help in the field, Jiří Kučera a Jan Pivec for valuable comments and suggestions, Petr Zábanský for technical assistance, many workers of Lusatian Mts. PLA, Elbe Sandstone Mts. PLA, and Forest of the Czech Republic, state enterprise, for help and obligingness and to two anonymous reviewers for their in-depth reviews and valuable comments and suggestions. The work was funded by Ministry of Agriculture of the Czech Republic by research project no. QI92A207, QJ1220218, and by Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech

Republic by research project no. ČZU IGAFLD201113, ČZU IGAFLD20124354 a ČZU CIGA20124309.

References

- Anděl, J., 1998. Statistické metody. Matfyzpress, Praha.
- Angeloni, F., Ouborg, N.J., Leimu, R., 2011. Meta-analysis on the association of population size and life history with inbreeding depression in plants. *Biol. Cons.* 144, 35–43.
- Antonín, V., Tomšovský, M., Sedlák, P., Májek, T., Jankovský, L., 2009. Morphological and molecular characterization of the *Armillaria cepistipes* – *A. gallica* complex in the Czech Republic and Slovakia. *Mycol. Progress* 8, 259–271.
- Aylor, D.E., 2003. Spread of plant disease on a continental scale: role of aerial dispersal of pathogens. *Ecology* 84, 1989–1997.
- Bakys, R., Vasiliauskas, A., Ihrmark, K., Stenlid, J., Menkis, A., Vasaitis, R., 2011. Root rot, associated fungi and their impact on health condition of declining *Fraxinus excelsior* stands in Lithuania. *Scand. J. For. Res.* 26, 128–135.
- Bennie, J., Huntley, B., Wiltshire, A., Hill, M.O, Baxter, R., 2008. Slope, aspect and climate: Spatially explicit and implicit models of topographic microclimate in chalk grassland. *Ecol. Model.* 216, 47–59.
- Brasier, C.M., 2008. The biosecurity threat to the UK and global environment from international trade in plants. *Plant Pathol.* 57, 792–808.
- Burokiene, D., Prospero, S., Jung, E., Marciulyniene, D., Moosbrugger, K., Norkute, G., Rigling, D., Lygis, V., Schoebel, C.N., 2015. Genetic population structure of the invasive ash dieback pathogen *Hymenoscyphus fraxineus* in its expanding range. *Biol. Invasions*. DOI 10.1007/s10530-015-0911-6.
- Burnett, J., 2003. Fungal populations and species. Oxford University Press, New York.
- CBD, 2002. Convention on biological diversity. <http://www.cbd.int/convention/text/>. Accessed 22 Jul 2015.
- Condeso, T.E., Meentemeyer, R.K., 2007. Effects of landscape heterogeneity on the emerging forest disease sudden oak death. *J. Ecol.* 95, 364–375.
- Davidson, J.M., Wickland, A.C., Patterson, H.A., Falk, K.R., Rizzo, D.M., 2005. Transmission of *Phytophthora ramorum* in mixed-evergreen forest in California. *Phytopathology* 95, 587–596.
- Desprez-Loustau, M.-L., 2009. Alien fungi of Europe. In: DAISIE. Handbook of alien species in Europe. Springer, Berlin, 15–28.
- Dobrowolska, D., Hein, S., Oosterbaan, A., Skovsgaard, J.P., Wagner, S.P., 2008. Ecology and growth of European ash (*Fraxinus excelsior* L.), 35 pp.. <http://www.valbro.uni-freiburg.de/>. Accessed 22 Jul 2015.
- Eichhorn, J., Roskams, P., Ferretti, M., Mues, V., Szepesi, A., Durrant, D., 2010. International Co-operative Programme on Assessment and Monitoring of Air Pollution Effects on Forest (ICP Forest), part IV Visual Assessment of Crown Condition and Damaging Agents. Hamburg, UNECE ICP Forest Programme Co-ordinating Centre, 47 p.
- Enderle, R., Peters, F., Nakou, A., Metzler, B., 2013. Temporal development of ash dieback symptoms and spatial distribution of collar rots in a provenance trial of *Fraxinus excelsior*. *Eur. J. For. Res.* 132, 865–876.
- Enderle, R., Nakou, A., Thomas, K., Metzler B., 2015. Susceptibility of autochthonous German *Fraxinus excelsior* clones to *Hymenoscyphus pseudoalbidus* is genetically determined. *Annls For. Sci.* 72, 183–193.
- Franklin, J., 1995. Predictive vegetation mapping: geographic modelling of biospatial patterns in relation to environmental gradients. *Prog. Phys. Geog.* 19, 474–499.

- Frey, P., Gérard, P., Feau, N., Husson, C., Pinon, J., 2005. Variability and Population Biology of *Melampsora* Rusts on Poplars. In: Pei, M.H., Cracken, A.R. (Eds.), *Rust Diseases of Willow and Poplar*. CABI, Wallingford, pp. 63–72.
- Havrdoová, L., Novotná, K., Zahradník, D., Buriánek, V., Pešková, V., Šrůtka, P., Černý, K., (in review): A resistance of Czech *Fraxinus excelsior* population to ash dieback at the provenance level confirmed. *For. Pathol.*
- Husson, C., Caël, O., Grandjean, J.P., Nageleisen, L.M. and Marçais, B., 2012. Occurrence of *Hymenoscyphus pseudoalbidus* on infected ash logs. *Plant Pathol.* 61, 889–895.
- Geiger R., Aron R.H., Todhunter P. (2009): *The climate near the ground*. Rowman & Littlefield Publishers, Inc., Lanham, MA.
- Gross, A., Holdenrieder, O., Pautasso, M., Queloz, V., Sieber, T.N., 2014a. *Hymenoscyphus pseudoalbidus*, the causal agent of European ash dieback. *Mol. Plant. Pathol.* 15, 5–21.
- Gross, A., Hosoya, T., Queloz, V., 2014b. Population structure of the invasive forest pathogen *Hymenoscyphus pseudoalbidus*. *Mol. Ecol.* 23, 2943–2960
- Hietala, A.M., Timmermann, V., Børja, I., Solheim, H., 2013. The invasive ash dieback pathogen *Hymenoscyphus pseudoalbidus* exerts maximal infection pressure prior to the onset of host leaf senescence. *Fung. Ecol.* 6, 302–308.
- Keller, L.F., Waller, D.M., 2002. Inbreeding effects in wild populations. *Trends Ecol. Evol.* 17, 230–241.
- Kirisits, T., Freinschlag, C., 2012. Ash dieback caused by *Hymenoscyphus pseudoalbidus* in a seed plantation of *Fraxinus excelsior* in Austria. *J. Agric. Ext. Rural Dev.* 4, 184–191.
- Kowalski T. (2013): Foliar disease of broadleaved trees. 488-518., In: Gontier P., Nicolloti P. *Infectious forest diseases*. CABI, Wallingford, UK.
- Kowalski, T., Holdenrieder, O., 2008. A new fungal disease of ash in Europe (in German). *Schweiz. Z. Forstwes.* 159, 45–50.
- Kowalski, T., Holdenrieder, O., 2009. The teleomorph of *Chalara fraxinea*, the causal agent of ash dieback. *For. Pathol.* 39, 304–308.
- Lobo, A., McKinney, L.V., Hansen, J.K., Kjær E.D., Nielsen, L.R., 2015. Genetic variation in dieback resistance in *Fraxinus excelsior* confirmed by progeny inoculation assay doi: 10.1111/efp.12179.
- Lygis, V., Vasiliauskas, R., Larsson, K.-H. and Stenlid, J., (2006). Wood-inhabiting fungi in stems of *Fraxinus excelsior* in declining ash stands of northern Lithuania, with particular reference to *Armillaria cepistipes*. *Scand. J. For. Res.* 20, 337–346.
- Madden, L.V. Hughes, R., Bosch, F., van den, 2007. *The study of plant disease epidemics*. APS Press, St. Paul, MN.
- Magarey, R.D., Sutton, T.B., Thayer, C.L., 2005. A simple generic infection model for foliar fungal plant pathogens. *Phytopathology* 95, 92–100.
- McKinney, L.V., Thomsen, I.M., Kjær, E.D., Nielsen, L.R., 2012. Genetic resistance to *Hymenoscyphus pseudoalbidus* limits fungal growth and symptom occurrence in *Fraxinus excelsior*. *For. Pathol.* 42, 69–74.
- McKinney, L.V., Nielsen, L.R., Collinge, D.B., Thomsen, I.M., Hansen, J.K., Kjær, E.D., 2014. The ash dieback crisis: genetic variation in resistance can prove a long term solution. *Plant Pathol.* 63, 485–499.
- MEA, 2005. *Ecosystems and human well-being: biodiversity synthesis*. Millenium ecosystem assessment. World Resources Institute, Washington, DC.
- Meentemeyer, R.K., Cunniffe, N.J., Cook, A.R., Filipe, J.A.N., Hunter, R.D., Rizzo, D.M., Gilligan, C.A., 2011. Epidemiological modeling of invasion in heterogeneous landscapes: spread of sudden oak death in California (1990–2030). *Ecosphere* 2, doi:10.1890/ES10-00192.1.

- Meentemeyer, R.K., Haas, S.E., Václavík, T., 2012. Landscape epidemiology of emerging infectious diseases in natural and human-altered ecosystems. *Annu. Rev. Phytopathol.* 20, 379–402.
- Meentemeyer, R.K., Rank, N.E., Anacker, B.L., Rizzo, D.M., Cushman, J.H., 2008. Influence of land-cover change on the spread of an invasive forest pathogen. *Ecol. Appl.* 18, 159–171.
- Metzler, B., Enderle, R., Karopka, M., Töpfer, K., Aldinger, E., 2012. Entwicklung des Eschentriebsterbens in einem Herkunftsversuch an verschiedenen Standorten in Süddeutschland. *Allg. Forst- u. J.Ztg.* 183, 168–180.
- Mundt, C.C., Sackett, K.E., Wallace, L.D., 2011. Landscape heterogeneity and disease spread: experimental approaches with plant pathogen. *Ecol. Appl.* 21, 321–328.
- Pautasso, M., 2013. Responding to diseases caused by exotic tree pathogens. In: Gonthier, P., Nicolotti, G. (Eds.), *Infectious forest diseases*. CABI, Wallingford, pp. 592–612.
- Pei, M.H., Bayon, C., Ruiz, C., Tubby, I., 2007. Population structure of poplar rust *Melampsora larici-populina* in the UK inferred from AFLP. *Plant Pathol.* 56, 472–479.
- Pezzopane, J.R.M., Bosi, C., Nicodemo, M.L.F., Santos, P.M., Cruz, P.G. da, Parmejiani, R.S., 2015. Microclimate and soil moisture in a silvopastoral system in southeastern Brazil *Bragantia Campinas* 74, 110–119.
- Pinon, J., Frey, P., 1997. Structure of *Melampsora larici-populina* populations on wild and cultivated poplar. *Eur. J. For. Pathol.* 103, 159–173.
- Plantagenest, M., Le May, C., Fabre, F., 2007. Landscape epidemiology of plant diseases. *J. R. Soc. Interface* 4, 963–972.
- Pliūra, A., Lygis, V., Suchockas, V., Bartkevičius, E., 2011. Performance of twenty-four European *Fraxinus excelsior* populations in three Lithuanian progeny trials with a special emphasis on resistance to *Chalara fraxinea*. *Balt. For.* 17, 17–34.
- Pliūra, A., Marčiulyrienė, D., Bakys, R., Suchockas, V., 2014. Dynamics of genetic resistance to *Hymenoscyphus pseudoalbidus* in juvenile *Fraxinus excelsior* clones. *Balt. For.* 20, 10–27.
- Průša, E., 2001. Pěstování lesů na typologických základech. *Lesnická práce*, Praha.
- R Core Team (2015). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org/>, Jul 22 2015.
- Rencher, A.C., 2002. *Methods of Multivariate Analysis*. John Wiley & Sons, New York.
- Sakai, A.K., Allendorf, F.W., Holt, J.S., Lodge, D.M., Molofsky, J., With, K.A., Baughman, S., Robert, J.C., Cohen, J.E., Ellstrand, N.C. et al., 2001. The population biology of invasive species. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 32, 305–332.
- Santini, A., Ghelardini L., De Pace, C., Desprez-Loustau, M. L., Capretti, P., Chandelier, A., Cech, T., Chira, D., Diamandis, S., Gaitniekis, T., Hantula, J., Holdenrieder, O., Jankovsky, L., Jung, T., Jurc, D., Kirisits, T., Kunca, A., Lygis, V., Malecka, M., Marçais B., Schmitz, S., Schüller, S., Kapeller, S., Konrad, H., Geburek, T., Mengl, M., Bozzano, M., Koskela, J., Lefevre, F., Hubert, J., Kraigher, H., Longauer, R., Olrik, D.C., 2013. Adaptive genetic diversity of trees for forest conservation in a future climate: a case study on Norway spruce in Austria *Biodivers. Conserv.* 22, 1151–1166
- Schumacher, J., 2011. The general situation regarding ash dieback in Germany and investigations concerning the invasion and distribution strategies of *Chalara fraxinea* in woody tissue. *EPPO Bull.* 40, 7–10.
- Schumacher, J., Solheim H., Solla, A., Szabo, I., Tsopelas, P., Vannini, A., Vettraino, A.M., Webber, J., Woodward, S., Stenlid, J., 2013. Biogeographical patterns and determinants of invasion by forest pathogens in Europe. *New Phytol.* 197, 238–250.
- Sinclair, W.A., Lyon, H.H., 2005. *Diseases of forest trees and shrubs*. CUP, Ithaca, NY.
- Skovsgaard, J.P., Thomsen, I.M., Skovsgaard, I.M., Martinussen, T., 2010. Associations among symptoms of dieback in even-aged stands of ash (*Fraxinus excelsior* L.). *Forest Pathol.* 40, 7–18.

- Smitley, D., 2008. Four-year test shows that an annual basal drench with imidacloprid protects trees from emerald ash borer. *Int. Pest Manag. Res.* 6, 23.
- Stener, L.-G., 2012. Clonal differences in susceptibility to the dieback of *Fraxinus excelsior* in southern Sweden. *Scand. J. For. Res.* 28, 205–16.
- Timmerman, V., Børja, I., Hietala, A.M., Kirisits, T., Solheim, H., 2011. Ash dieback: pathogen spread and diurnal patterns of ascospore dispersal, with special emphasis on Norway. *OEPP/EPPO Bulletin* 41, 14–20.
- Tolasz, R., Brázdil, R., Bulíř, O., Dobrovolný, P., Dubrovský, M., Hájková, M., Halásová, M., Hostýnek, J., Janouch, M., Kohut, M., et al., 2007. *Climate Atlas of Czechia*. ČHMÚ, Univerzita Palackého v Olomouci, Praha, Olomouc.
- Veverka, B., Zimová, R., 2008. Topografická a tématická kartografie. ČVUT, Praha.
- Wardle, P., 1961. Biological flora of the British Isles. *Fraxinus excelsior* L. *J. Ecol.* 49, 739–751.
- Westphal, M.I., Browne, M., MacKinnon, K., Noble, I., 2008. The link between international trade and the global distribution of invasive alien species. *Biol. Invasions* 10, 391–398.
- Wulf, A., 1944. Fungal leaf diseases of maple with special consideration of the sycamore maple (*Acer pseudoplatanus* L.). *Schriften aus der Forstliche Fakultät der Universität Göttingen und der Niedersächsischen Forstlichen Versuchsanstalt. J.* Sauerländer's Verlag, Frankfurt.

6. Diskuse

V letech 2011–2013 proběhla v pestré krajině CHKO Lužické hory charakteristické vysokou lesnatostí a četným zastoupením pastvin a luk s remízy a další roztroušenou zelení rozsáhlá studie, sledující dopad invaze nekrózy jasanu v různých typech vegetace. Vegetace byla rozdělena do pěti typů na základě ekologické a krajinářské funkce na solitérní jedince, roztroušenou výsadbu (remízy, větrolamy), břehové porosty, lesní výsadby (suťové porosty) a nivní jasanovo-olšové luhy. Míra napadení nekrózou jasanu byla sledována na 80 trvalých plochách (kruh o poloměru 50 m), celkově bylo hodnoceno 1045 dřevin jasanu ztepilého. Měření bylo vždy ukončeno před předčasným opadem listů. Vlhkost vzduchu byla měřena pomocí automatických dataloggerů Minikin THi na 50ti plochách, dataloggerby byly umístěny 4,5 m nad zemí ve středu ploch, vzdušná vlhkost byla měřena v době největšího šíření askospor (červenec – srpen; Timmermann a kol. 2011) v r. 2012. Celkově bylo hodnoceno 27 nezávislých proměnných popisujících prostředí, vegetaci, topografii aj., které potencionálně ovlivňují dopad onemocnění.

Vytvořeno bylo několik GLM modelů (R Plus) vysvětlujících dopad patogenu. Nejúspěšnější model vysvětluje 27 % variability dat a zahrnuje 12 důležitých proměnných. Pozitivní vliv na rozvoj choroby měly faktory přítomnost *Armillaria* sp. na hostiteli, pokryvnost stromového patra, míra zastínění koruny okolními stromy, severní orientace, směrodatná odchylka TPI5 a nadmořské výšky, plocha jasanů na ploše a míra proschnutí nejbližšího hostitele. Negativní vliv na rozsah choroby měly naopak výskyt *Aceria fraxinivorus*, vysoká směrodatná odchylka sklonu terénu a sklon a výška stromu. Pro každý typ porostu byly zvláště vytvořeny detailní GLM modely. Tyto dílčí modely vysvětlovaly 28 – 46 (–94) % variability dat a výrazně se od sebe lišily.

Faktory prostředí, které ovlivňovaly rozsah poškození lze rozdělit do pěti skupin podle charakteru a vlivu. V první skupině proměnných popisující množství biomasy jasanu a pozitivně ovlivňující míru onemocnění jsou plocha korun jednotlivých jasanů, plocha korun všech jasanů a podíl jasanu na stanovišti. Tyto proměnné pozitivně ovlivňují možnost kolonizace stanoviště patogenem a navíc množství sekundárního inokula na stanovišti (Mundt a kol. 2011). Jejich vliv byl předpokládán a byl v souladu s faktem, že epidemie nekrózy jasanu potřebuje dostatečnou akumulaci jednotlivých

náchylných hostitelů (Schumacher 2011; Gross a kol. 2014) nebo, lépe, dosažitelné biomasy. Podmínka dostatečně silného zdroje substrátu je ovšem obecně platná a lze ji identifikovat např. u náhlého odumírání dubu v Severní Americe – SOD (Condeso a Meentemeyer 2007) a u mnoha jiných onemocnění.

Druhá skupina proměnných popisuje vzdálenost a míru napadení nejbližšího okolního napadeného hostitele jako potenciálního zdroje inokula. Ve vývoji onemocnění je z hlediska potenciálu šíření patogenu vzdálenost od okolního napadeného hostitele velmi důležitá a je velmi významnou proměnnou v krajinných modelech popisujících prostorový pattern distribuce významných chorob dřevin včetně SOD (Meentemeyer a kol. 2011, 2012).

Proměnné ve třetí skupině popisují terén a charakteristiku stanoviště a mohou být charakterizovány jako nepřímé faktory (Franklin 1995). Tyto proměnné ovlivňují pozitivně nebo negativně mikroklima včetně vlhkosti vzduchu (Bennie a kol. 2008; Meentemeyer a kol. 2012; Geiger a kol. 2009; Pezzopane a kol. 2015), které významně ovlivňuje epidemiologii nekrózy jasanu (viz níže).

Pokryvnost stromového patra, zástin koruny, vzdálenost od vody, orientace, přítomnost keřového patra a nekoseného bylinného porostu a charakteristika morfologie terénu popisující jeho drsnost (heterogenita nadmořské výšky a TPI) ovlivňují různými způsoby přízemní vlhkost vzduchu pozitivně, zatímco sklon a jeho směrodatná odchylka mají negativní vliv na vlhkost vzduchu (Geiger a kol. 2009). Schumacher (2011) v souladu s prezentovanými zjištěními uvádí, že uzavřené porosty jsou více rizikové pro rozvoj nekrózy jasanu. Podobně, jak již bylo opakovaně publikováno, výška stromu ovlivňuje úroveň napadení negativně, přičemž mladší a menší stromy jsou obvykle poškozovány ve větší míře (Kowalski a Holdenrieder 2008; Schumacher 2011; Kirisits a Freinschlag 2012), protože jejich koruny jsou v kratší vzdálenosti od zdroje infekčního inokula v opadance. Další roli pravděpodobně hraje fakt, že infekční tlak je nižší a vyspělost listů a (nebo) mikroklimatické podmínky jsou méně vhodné pro rozvoj infekce v korunách vyšších stromů (Gross a kol. 2014).

Nemocné jasanu jsou souběžně napadány dalšími patogeny či škůdci. Organismy s pozitivním dopadem na rozvoj choroby jsou václavky *Armilaria* spp. (převážně *A. cepistipes*) a lýkohub jasanový (*Hylesinus fraxini*) a tvoří čtvrtou skupinu proměnných. Negativní dopad infekcí *Armilaria* spp. na rozsah poškození nekrózou jasanů byl opakovaně potvrzen (Lygis a kol. 2006; Skovsgaard a kol. 2010; Bakys a kol.

2011; Husson a kol. 2012) a podobný efekt byl také zjištěn u *Hylesinus fraxini* (Havrdová a kol. v řízení).

V páté skupině proměnných ovlivňující nekrózu jasanu průkazně negativně jsou souběžná mírná poškození způsobená rážovkou (*Nectria* sp.) a vlnovníkem jasanovým (*Aceria fraxinivorus*). Mechanismus působení těchto organismů na infekci *H. fraxineus* není znám, ale lze předpokládat, že mohou indukovat tvorbu sekundárních metabolitů, které pak mohou být souběžné účinné i proti infekci *H. fraxineus*. Zejména efekt *Aceria fraxinivorus* ($p < 0,01$ v obecném modelu onemocnění) by mohl podpořit průzkum účinné biologické kontroly.

Poslední pozitivní vliv na míru rozsahu nekrózy jasanu byl potvrzen u mechanického poškození (mrazová poškození apod.), který byl zjištěn u solitérní výsadby, pravděpodobně v důsledku snížené fitness poškozených dřevin.

Zjištěna byla průkazná regrese ($r = 0.45$, $p < 0.0001$) podílu nekrózy na ploše na počet dní s vlhkostí vzduchu vyšší než > 95 % mezi 06 – 11 hod. v období největšího výskytu askospor, tj. od července do srpna. Toto zjištění je v souladu se zjištěním Schumachera (2011), že nebezpečí onemocnění je vyšší na celoročně zamokřených půdách. Toto pravděpodobně zásadní zjištění by mohlo být spojeno s několika body v biologii patogenu a epidemiologii onemocnění. Za prvé, vlhké podmínky jsou příznivé pro infekci rostlin listovými houbovými patogeny obecně (Magarey a kol. 2005). Vlhkost vzduchu na stanovišti pravděpodobně ovlivňuje množství a dobu vzniku a zrání plodniček na řapících a listech v jasanovém opadu z předešlého roku. Nedostatek vlhkosti může také ovlivnit množství uvolňovaných spor jako v případě jiných listových patogenů (Wulf 1994). Askospory patogenu se šíří především v ranních hodinách (Timmermann a kol. 2011; Hietala a kol. 2013) když se vzduch u země začíná oteplovat a stoupat. Spory patogenu jsou tímto stoupajícím vzdušným prouděním unášeny do korun stromů, kde infikují listy jasanu. Vzhledem k tenké buněčné stěně jsou askospory rovněž citlivé vůči suchu (Aylor 2003; Gross a kol. 2014). Nakonec, po přisednutí k listu jsou klíčící askospory chráněny proti vysychání ovlhčením listu ranní rosou (Hietala a kol. 2013), stejně jako v případě jiných listových patogenů například *Apiogmonia veneta*, *Glomerella cingulata*, atd. (Sinclair a Lyon 2005). Navíc hluboké a vlhké půdy vytvářejí optimální podmínky pro růst jasanů (Wardle, 1958; Dobrowolska 2008), kterým se v těchto podmínkách velmi daří. Vytvářejí tak enormní množství kolonizovatelného substrátu, který představuje značný zdroj pro patogen v

dalším cyklu choroby. Vztah mezi vlhkostí vzduchu a podílem napadení může být tedy částečně způsoben zpětnou vazbou patogenu na množství dostupného substrátu.

Jelikož je přízemní vzdušná vlhkost, mimo jiné, ovlivněna typem porostu, zástínem, přítomností vody, morfologií terénu atd. (Geiger a kol. 2009), byl vyvinut GLM model vysvětlující variabilitu vzdušné vlhkosti na výzkumných plochách. Model vysvětloval 77 % variability dat a podílely se na něm proměnné TPI5 a směrodatná odchylka TPI5, orientace, nadmořská výška, vzdálenost od vody a silnice, pokryvnost stromového a keřového patra, přítomnost nekoseného travního porostu, výška stromu a výška nasazení koruny hostitele. Kromě toho byl jako faktor ovlivňující dopad onemocnění identifikován typ krajinného tvaru – porosty na vrcholech nebo vypuklých svazích byly méně napadeny než porosty v rovinných vhloubených údolních tvarech. Příčinu tohoto rozdílu lze rovněž hledat v odlišné vlhkosti prostředí těchto tvarů.

Byly měřeny objemy korun všech dřevin, odhadnuto jejich prosýchání a bylo vypočteno skutečné poškození koruny. Rozsah poškození se statisticky významně lišil v různých typech porostu. Obecně platí, že solitérní výsadba a suťové lesy byly průkazně méně poškozené než jasanové olšiny a břehové porosty. Poškození roztroušené výsadby nebylo statisticky odlišné od ostatních typů porostu. Bylo zjištěno, že celkový objem korun (množství kolonizovatelného substrátu) odpovídá skutečnému objemu poškození korun jasanu. Nechráněné typy porostu v otevřené krajině s větším objemem korun (roztroušená výsadba a břehové porosty) byly při porovnání s vegetací s menším objemem korun (solitérní výsadba) více poškozeny. Lesní typy vegetace obklopené zapojeným lesem byly v porovnání s porosty v otevřené krajině (břehové porosty a roztroušená výsadba) se srovnatelným objemem korun méně poškozené. Poškození korun na stanovištích s větší vzdušnou vlhkostí (břehové porosty a jasanové olšiny) bylo větší než na stanovištích bez přítomnosti vody. Tyto rozdíly lze snadno vysvětlit tak, že první jsou invadovány porosty více exponované (a tedy snadněji askosporami kolonizovatelné), přičemž spíše budou napadeny porosty rozsáhlejší (s větším objemem korun či jejich profilem). Ve větších porostech pak vzniká větší množství sekundárního inokula, které primárně infikuje lokální porost a rozdíl v poškození se zvyšuje. Porosty lesní, obklopené souvislými lesy jsou korunami okolních dřevin chráněny a tedy jsou napadány s menší pravděpodobností a později, proto je jejich poškození v současné době nižší – a to proto, že v době průzkumu se oblast nacházela pravděpodobně těsně za čelem postupující epidemie. Vzhledem k vyšší

produkci sekundárního inokula a charakteristikám stanoviště zapojeného porostu (vlhkost) bude napadení těchto porostů rychleji narůstat. Porosty ve vlhkých podmínkách jsou samozřejmě více napadeny vzhledem ke zjištěné vazbě výskytu a intenzity choroby na vzdušnou vlhkost.

Na výzkumných plochách se průměrné poškození korun z 9,83 % v r. 2011 zvýšilo na 13,08 % v r. 2013, to znamená, že e prosychání korun zvýšilo o 3,25 % (relativně o necelých 25%). Podobné zvýšení poškození zjištěné během dvou let v Rakousku bylo vyhodnoceno jako pouze mírné (Kessler a kol. 2012). Vyjádření nárůstu poškození v procentech není ovšem zcela přesné, protože je ignorován souběžný přírůstek jasanů. Při posouzení reálného objemu poškození bylo zjištěno, že nárůst objemu poškozených korun dosáhl během dvou let přes 43%. V tomto pohledu je zvýšení poškození korun relativně vysoké. Kromě toho byla zřejmě v r. 2013 epidemie v prvních fázích vývojové křivky onemocnění (srv. Madden a kol. 2007) a oblast na čele fronty postupu epidemie Evropou (Gross a kol. 2014), tudíž masivní nárůst škod lze ve zkoumané oblasti ještě očekávat.

Výsledky této práce jasně podporují myšlenku, že management onemocnění založený na využití zdrojů rezistence může být efektivně doplněn vhodným managementem krajiny a lesa, přinejmenším alespoň vhodným managementem méně citlivých typů vegetace anebo ve více různorodých územích. Vzhledem k tomu, že vzdušná vlhkost je jedním z klíčových faktorů epidemiologie nekrózy jasanu, lze očekávat, že management choroby bude více účinný v oblastech s poněkud více kontinentálním klimatem a v západní Evropě vzhledem k oceánickému klimatu může být obtížnější.

7. Závěr

Během posledních dvou desetiletí, nepůvodní houbový invazní patogen *Hymenoscyphus fraxineus* rychle obsadil evropský kontinent a nekróza jasanu se stala závažným problémem v řadě oblastí. Onemocnění se stává významnou hrozbou pro biodiverzitu v lesních ekosystémech a ekonomické a estetické dopady jsou obrovské (Mc Kinney a kol. 2014). Extrémní dopad patogenu v různých ekosystémech téměř po celé Evropě navozuje představy, že úspěšný management choroby je málo pravděpodobný. Vzhledem k tomu, že část dřevin (obvykle <1%) jevila v infekčních testech určitou míru rezistence, jak potvrzuje mnoho studií z několika evropských zemí (Pliūra a kol. 2011, 2014; Kiristits a Freinschlag 2012; Metzler a kol. 2012; McKinney a kol. 2012, 2014; Enderle a kol. 2013, 2015; Stener 2013; Lobo a kol. 2015), pozornost mnoha fytopatologů se upoutala na vyhledávání více odolných jedinců, jako nejslibnější či dokonce jedinou cestu v managementu choroby. Nicméně přílišné spoléhání na využití rezistentních genotypů a jejich následujícím šlechtění by mohla vést k nežádoucím důsledkům – např. k posílení ztráty genetické rozmanitosti jasanu, nebo k urychlení evoluce patogenu.

Předložený rozsáhlý průzkum dopadu nekrózy jasanu v různých typech porostů v krajině ukázal, že dopad této choroby šířící se vzduchem (“airborne disease”) je více nebo méně určen faktory životního prostředí a pěstebními charakteristikami výsadeb. Jako velmi důležitý faktor odpovědný za významnou část variability dat onemocnění se ukázala vlhkost vzduchu. Bylo prokázáno, že vlhkost vzduchu je z velké části určena lokálními přírodními podmínkami a pěstebními vlastnostmi. Mezi významnými charakteristikami, ovlivňujícími dopad onemocnění byly následující: typ porostu, podíl jasanu na ploše, výška stromu, plocha hostitele, keřové patro a travinný porost, zástín koruny, sklon, vertikální heterogenita, TPI (Topographic Position Index), geomorfologie, vzdálenost a míra poškození nejbližšího okolního napadeného hostitele, vzdálenost od vody, náhodný výskyt jiných patogenů a škůdců atd.

Předložená studie poskytuje dobrou příležitost k vytvoření vhodných a účelných strategií managementu choroby v různých ekosystémech s jasanem a může představovat cenný příspěvek k vývoji integrovaného managementu choroby. Nicméně úspěch budoucí strategie managementu choroby bude vysoce závislý na aktivním a uvážlivém přístupu správců lesa a vlastníků, agentury přírody, místních samospráv atd.

8. Literatura

- Anděl, J., 1998. Statistické metody. Matfyzpress, Praha. 274 s.
- Aylor, D. E. 2003. Spread of plant disease on a continental scale: role of aerial dispersal of pathogens. *Ecology* 84, 1989–1997.
- Bajcar, V. a Longauer, R. 2012. Poznatky o biológii, reprodukčních procesoch a genofonde jaseňa štíhlého (*Fraxinus excelsior* L.) a jaseňa úzkolistého (*Fraxinus angustifolia* Vahl.). *Forestry Journal* 58(3), 181–189.
- Bakys, R., Vasaitis, R., Barklund, P., Ihrmark, K. a Stenlid, J. 2009a. Investigations concerning the role of *Chalara fraxinea* in declining *Fraxinus excelsior*. *Plant Pathology* 58, 284–292.
- Bakys, R., Vasaitis, R., Barklund, P., Thomsen, I., Stenlid, J. (2009b. Occurrence and pathogenicity of fungi in necrotic and nonsymptomatic shoots of declining common ash (*Fraxinus excelsior*) in Sweden. *Eur J Forest Res.* 128, 51–60.
- Bakys, R., Vasiliauskas, A., Ihrmark, K., Stenlid, J., Menkis, A. and Vasaitis, R. 2011. Root rot, associated fungi and their impact on health condition of declining *Fraxinus excelsior* stands in Lithuania. *Scand. J. For. Res.* 26, 128–135.
- Baral, H. O., Queloz, V., Hosoya, T. 2014. *Hymenoscyphus fraxineus*, the correct scientific name for the fungus causing ash dieback in Europe. *IMA Fungus* 5(1) 79–80.
- Barić, L., Diminić, D. 2010. First report of the pathogenic fungus *Chalara fraxinea* Kowalski on common ash (*Fraxinus excelsior* L.) in Gorski Kotar. *Glasilo Biljne Zaštite*, 10, 1–2.
- Bengston, S. B. K., Barklund, P., von Brömssen, C., Stenlid, J. 2014. Seasonal Pattern of Lesion Development in Diseased *Fraxinus excelsior* Infected by *Hymenoscyphus pseudoalbidus*. *PLoS ONE* 9(4), e76429. DOI:10.1371/journal.pone.0076429.
- Bennie, J., Huntley, B., Wiltshire, A., Hill, M.O, Baxter, R. 2008. Slope, aspect and climate: Spatially explicit and implicit models of topographic microclimate in chalk grassland. *Ecological Modelling* 216, 47–59.
- Buček, A., Lacina, J. 2007. Geobiocenologie II. Geobiocenologická typologie krajiny České Republiky. Mendlova zemědělská a lesnická univerzita v Brně. 251s. ISBN 978-80-7375-046-6

- Clary, M. R., Arhipova, N., Gaitnieks, T., Stenlid, J., Vasaitis, R. 2013. Natural infection of *Fraxinus excelsior* seeds by *Chalara fraxinea*. *Forest Pathology* 43, 83–85.
- Condeso, T. E., Meentemeyer, R. K. 2007. Effects of landscape heterogeneity on the emerging forest disease sudden oak death. *Journal of Ecology* 95, 364–375.
- Černý, K., Gregorová, B., Holub, V., Strnadová, V., Mrázková, M. 2007. Grafióza jilmů v ČR – fytopatologické a ekologické souvislosti. In: Dreslerová et Packová /ed./ *Ohrožené dřeviny České republiky*. Geobiocenologické spisy 12, s. 30–43.
- Černý, K., Strnadová, V. 2010: *Phytophthora Alder Decline: Disease Symptoms, Causal Agent and its Distribution in the Czech Republic*. *Plant Protection Science* 46, 12–18.
- Černý, K. 2011. Nebezpečné patogeny lesních dřevin *Phytophthora alni* a *Chalara fraxinea*: rozšíření, význam a možná rizika vyplývající z jejich zdomácnění. *Zpravodaj Ochrany Lesa*, 15, 71–75.
- Davydenko, K., Vasaitis, R., Stenlid, J., Menkis, A. 2013. Fungi in foliage and shoots of *Fraxinus excelsior* in eastern Ukraine: a first report on *Hymenoscyphus pseudoalbidus*. *Forest Pathology* 43, 462–7.
- Demek, J. 1988. *Obecná geomorfologie*. Academia Praha (1988) 476 s. ISBN: 21-116-87.
- Dobrowolska, D., Hein, S., Oosterbaan, A., Skovsgaard, J. P., Wagner, S. P. 2008. Ecology and growth of European ash (*Fraxinus excelsior* L.). 35 s. [on-line]. Dostupné na WWW: <http://www.valbro.uni-freiburg.de>>.
- Drenkhan, R., a Hanso, M. 2010. New host species for *Chalara fraxinea*. *New Disease Reports* 22, 16.
- Drenkhan, R., Sander, H., Hanso, M. 2014. Introduction of Mandshurian ash (*Fraxinus mandshurica* Rupr.) to Estonia: Is it related to the current epidemic on European ash (*F. excelsior*)? *Eur. J. Forest Res.* 133, 769–781.
- Eichhorn, J., Roskams, P., Ferretti, M., Mues, V., Szepesi, A., Durrant, D. 2010. International Co-operative Programme on Assessment and Monitoring of Air Pollution Effects on Forest (ICP Forest), part IV Visual Assessment of Crown Condition and Damaging Agents. Hamburg, UNECE ICP Forest Programme Coordinating Centre, 47 p., ISBN 978–3–926301–03–1.

- Enderle, R., Peters, F., Nakou, A., Metzler, B. 2013. Temporal development of ash dieback symptoms and spatial distribution of collar rots in a provenance trial of *Fraxinus excelsior*. Eur. J. Forest Res. 132, 865–876.
- Anderle, R., Nakou, A., Thomas, K., Metzler, B. 2015. Susceptibility of autochthonous German *Fraxinus excelsior* clonek to *Hymenoscyphus pseudoalbidus* is genetically determined. Annals of Forest Science 72, 183–193. DOI 10.1007/s13595-014-0413-1.
- EPPO 2007. Ash dieback in Europe and possible implication of *Chalara fraxinea*. Addition to the EPPO Alert List. EPPO Reporting Service 2007/179.
- EPPO 2008a. First report of *Chalara fraxinea* in Norway. EPPO Reporting Service 2008/181.
- EPPO 2008b. First report of *Chalara fraxinea* in Finland. EPPO Reporting Service 2008/182.
- EPPO 2010. *Chalara fraxinea*, Ash dieback. EPPO Reporting Service . [on-line].
Dostupné na WWW:
<http://www.eppo.org/QUARANTINE/Alert_List/fungi/Chalara_fraxinea.htm>.
- Franklin, J. 1995. Predictive vegetation mapping: geographic modelling of biospatial patterns in relation to environmental gradients. Prog. Phys. Geog. 19, 474–499.
- Gregorová, B., Černý, K., Holub, V., Strnadová, V., Rom, J., Šumpich, J., Kloudová, K. 2006. Poškození dřevin a jeho příčiny. VÚKOZ, Praha, 504 s.
- Geiger, R., Aron, R. H., Todhunter, P. 2009. The climate near the ground. Rowman & Littlefield Publishers, Inc., Lanham, MA, US, 623 s.
- Gross, A., Holdenrieder, O., Pautasso, M., Queloz, V., Sieber, T. N. 2014. *Hymenoscyphus pseudoalbidus*, the causal agent of European ash dieback. Mol. Plant Pathol. 15(1), 5–21.
- Halmschlager, E., Kirisits, T. 2008. First report of the ash dieback patogen *Chalara fraxinea* on *Fraxinus excelsior* in Austria. Plant Pathology 57, 1177.
- Havrdová, L., Černý, K. 2011. Nekróza jasanu – epidemiologie, symptomy, možnosti ochrany. Aktuální problematika lesního školkařství ČR v r. 2011, 39–46.
- Havrdová, L., Černý, K. 2012. Invaze *Chalara fraxinea* v CHKO Lužické hory – předběžné výsledky výzkumu. Acta Pruhoniana 100, 137–145.
- Havrdová, L., Novotná, K., Zahradník, D., Buriánek, V., Pešková, V., Šrůtka, P., Černý, K. (v řízení). A resistance of Czech *Fraxinus excelsior* population to ash dieback at the provenance level confirmed.

- Hendry, S. 2012. Situation with ash in the United Kingdom: stand characteristics, health condition, ongoing work and research needs. In: Vasaitis R, ed. COST ACTION FP1103 FRAXBACK 1st MC/WG.
- Hietala, A.M., Timmermann, V., Børja, I., Solheim, H. 2013. The invasive ash dieback pathogen *Hymenoscyphus pseudoalbidus* exerts maximal infection pressure prior to the onset of host leaf senescence. *Fungal Ecology* 6, 302–8.
- Husson, C., Scala, B., Caël, O., Frey, P., Feau, N., Ioos, R., Marçais, B. 2011. *Chalara fraxinea* is an invasive pathogen in France. *European Journal for Plant Pathology* 130, 311–324.
- Husson, C., Caël, O., Grandjean, J. P., Nageleisen, L. M. and Marçais, B. 2012. Occurrence of *Hymenoscyphus pseudoalbidus* on infected ash logs. *Plant Pathology* 61, 889–895.
- Chandelier, A., Delhaye, N., Helson, M. 2011. First Report of the Ash Dieback Pathogen *Hymenoscyphus pseudoalbidus* (Anamorph *Chalara fraxinea*) on *Fraxinus excelsior* in Belgium. *Plant Disease* 95(2), 220.
- Jankovský, L., Palovčíková, D. 2008. Zavlečené choroby na dřevinách – I. Díl. *Zahradaweb* 2008. [on-line]. Dostupné na WWW: [http://www.zahradaweb.cz/informace-z-oboru/skolkarstvi/Zavlecene-choroby-na-drevinach- %E2%80%93-I.dil_s515x44814.html](http://www.zahradaweb.cz/informace-z-oboru/skolkarstvi/Zavlecene-choroby-na-drevinach-%E2%80%93-I.dil_s515x44814.html).
- Jankovský, L., a Holdenrieder, O. 2009. *Chalara fraxinea* – Ash Dieback in the Czech Republic. *Plant Prot. Sci.* 45, 74–78.
- Jankovský, L., Šťastný, P., Palovčíková, D. 2009. Nekróza jasanu *Chalara fraxinea* v ČR. *Lesnická Práce* 88(1), 16–17.
- Jenness, J. 2001. Topographic Position Index (TPI). Jenness Enterprises, Flagstaff, USA [on-line]. Dostupné na WWW: <http://www.jennessent.com/arcview/tpi.htm>.
- Kirisits, T., Halmschlager, E. 2008. Eschenpilz nachgewiesen. *Forstzeitung* 2, 32–33.
- Kirisits, T., a Czech, T. L. 2009. Observation on the sexual stage of the ash dieback pathogen *Chalara fraxinea* in Austria. *Forstschutz Aktuell* 48. 21–25.
- Kirisits, T., Matlakova, M., Mottinger-Kroupa, S., Cech, T. L. a Halmschlager, E. 2009. The current situation of ash dieback caused by *Chalara fraxinea* in Austria. In: Doğmuş-Lehtijärvi, T. (ed.): Proceedings of the conference of IUFRO working party 7.02.02. Foliage, shoot and stem diseases of forest trees. Eğirdir, Turkey,

- May 11-16 2009. SDU Faculty of Forestry Journal, ISSN: 1302-7085, Serial: A, Special Issue, 97-119.
- Kirisits, T., Matlakova, M., Mottinger-Kroupa, S., Halmschlager, E., Lakatos, F. 2010. *Chalara fraxinea* associated with dieback on narrow-leafed ash (*Fraxinus angustifolia*). Plant Pathology 59, 411.
- Kirisits, T., Freinschlag, C. 2012. Ash dieback caused by *Hymenoscyphus pseudoalbidus* in a seed plantation of *Fraxinus excelsior* in Austria Journal of Agricultural Extension and Rural Development 4(9), 184–191.
- Kirisits, T. 2015. Ascocarp formation of *Hymenoscyphus fraxineus* on several-year-old pseudosclerotial leaf rachies of *Fraxinus excelsior*. Forest Pathology, doi: 10.1111/efp.12183.
- Koukol, O. a Havrdová, L. 2014. Vřeckovýtrusná zkáza jasanů. Živa 1/2014, 7–10.
- Kowalski, T. 2001. O zamieraniu jesionów [About ash dieback]. Trybuna Leśnika 4, 6–7.
- Kowalski, T. 2006. *Chalara fraxinea* sp. nov. associated with dieback of ash (*Fraxinus excelsior*) in Poland. Forest Pathology 36, 264–270.
- Kowalski, T. a Holdenrieder, O. 2008. A new fungal disease of ash in Europe (in German). Schweiz. Z. Forstwes. 159, 45–50.
- Kowalski, T., Holdenrieder, O. 2009a. Pathogenicity of *Chalara fraxinea*. Forest Pathology 39, 1–7.
- Kowalski, T. a Holdenrieder, O. 2009b. The teleomorph of *Chalara fraxinea*, the causal agent of ash dieback. Forest Pathology 39, 304–308.
- Kowalski, T., Łukomska, A. 2005. The studies on ash dying (*Fraxinus excelsior* L.) in the Włoszczowa Forest Unit stands. Acta Agrobotanica 58, 429–439.
- Lobo, A., McKinney, L. V., Hansen, J. K., Kjær, E. D. and Nielsen, L. R. 2015. Genetic variation in dieback resistance in *Fraxinus excelsior* confirmed by progeny inoculation assay DOI: 10.1111/efp.12179.
- Löw, J., Buček, A., Lacina, J., Míchal, I., Plos, J., Petříček, V. 1995. Rukověť projektanta místního územního systému ekologické stability. Doplněk Brno 1995. 122s. ISBN 80-85765-55-1.
- Lygis, V., Vasiliauskas, R., Larsson, K. H. a Stenlid, J. 2006. Wood-inhabiting fungi in stems of *Fraxinus excelsior* in declining ash stands of northern Lithuania, with particular reference to *Armillaria cepistipes*. Scand. J. For. Res. 20, 337–346.

- Lygis, V., Rigling, D., Burokienė, D., Marčiulynienė, D., Schöebel, C. N., Norkutė, G., 2015. Virulence of *Hymenoscyphus fraxineus* isolates from Lithuanian (post-epidemic) and Swiss (epidemic) populations COST ACTION FP1103 FRAXBACK 1st MC/WG Dubrovnik.
- Madden, L.V., Hughes, R., Bosch, F. van den, 2007. The study of plant disease epidemics. APS Press, St. Paul, MN, USA, 421 p.
- Magarey, R.D., Sutton, T.B., Thayer, C.L., 2005. A simple generic infection model for foliar fungal plant pathogens. *Phytopathology* 95, 92–100.
- McKinney, L. B., V., Nielsen, L. R., Hansen, J. K., Kjær, E. D. 2011. Presence of natural genetic resistance in *Fraxinus excelsior* (*Oleraceae*) to *Chalara fraxinea* (*Ascomycota*): an emerging infectious disease. *Heredity* 106, 788–797.
- McKinney, L. V., Thomsen I. M., Kjær, E. D. a Nielsen L. R. 2012. Genetic resistance to *Hymenoscyphus pseudoalbidus* limits fungal growth and symptom occurrence in *Fraxinus excelsior*. *Forest Pathology* 42, 69–74.
- Mc Kinney, L. V., Nielsen L. R., Collinge D. B., Thomsen I. M., Hansen J. K. a Kjær, E. D. 2014. The ash dieback crisis: genetic variation in resistance can prove a long-term solution. *Plant Pathology* 63, 485–499.
- Meentemeyer, R. K., Cunniffe, N. J., Cook, A. R., Filipe, J. A. N., Hunter, R. D., Rizzo, D. M. a Gilligan, C. A.. 2011. Epidemiological modeling of invasion in heterogeneous landscapes: spread of sudden oak death in California (1990–2030). *Ecosphere* 2(2), část 17. DOI:10.1890/ES10-00192.1.
- Meentemeyer, R. K., Haas, S. E., Václavík, T. 2012. Landscape epidemiology of emerging infectious diseases in natural and human-altered ecosystems. *Annu. Rev. Phytopathol.* 20, 379–402.
- Metzler, B., Enderle, R., Karopka, M., Töpfer, K., Aldinger, E. 2012. Entwicklung des Eschentriebsterbens in einem Herkunftsversuch an verschiedenen Standorten in Süddeutschland. *Allg. Forst- u. J,Ztg.* 183, 168–180.
- Mundt, C. C., Sackett, K. E., Wallace, L. D. 2011 Landscape heterogeneity and disease spread: experimental approaches with plant pathogen. *Ecol. Appl.* 21, 321–328.
- MZe NAZV QJ1220218 2014. Průběžná zpráva projektu: Vývoj efektivních opatření eliminujících dopad invaze *Chalara fraxinea* v lesním školkařství a v navazujících aspektech lesního a vodního hospodářství. (2012–2016) VÚKOZ, v. v. i. Průhonice.

- Nárovec, V., Trejtnarová, J., Jančařík, V. 2008a. Čeká i naše jasany chřadnutí? Lesu Zdar 14(5), 4–6.
- Nárovec, V., Trejtnarová, J., Jančařík, V., Čermák, M. 2008b. Chřadnutí jasanů, nové poznatky. Lesu Zdar 14(11), 4–6.
- Ogris, N., Hauptman, T., Jurc, D. 2009. *Chalara fraxinea* causing common ash dieback newly reported in Slovenia. Plant Pathology 58, 1173.
- Pagan, J. 1996. Lesnicka dendrologia. Zvolen: TU vo Zvolene, 378 s.
- Pezzopane, J. R. M., Bosi, C., Nicodemo, M. L. F., Santos, P. M., Cruz, P. G. a Parmejiani, R.S. 2015. Microclimate and soil moisture in a silvopastoral system in southeastern Brazil Bragantia, Campinas 74, 110-119.
- Pliūra, A.; Lygis, V.; Suchockas, V.; Bartkevičius, E., 2011: Performance of twenty-four European *Fraxinus excelsior* populations in three Lithuanian progeny trials with a special emphasis on resistance to *Chalara fraxinea*. Balt. For. 17, 17–34.
- Pliūra, A., Marčiulytienė, D., Bakys, R. a Suchockas V. 2014. Dynamics of Genetic Resistance to *Hymenoscyphus pseudoalbidus* in Juvenile *Fraxinus excelsior* Clones. Baltic Forestry 20(1), 10–27.
- Rencher, A. C. 2002. Methods of Multivariate Analysis. John Wiley & Sons. 708 s.
- R Core Team 2015. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. [on-line]. Dostupné na WWW: <http://www.R-project.org/>.
- Rytkönen, A., Lilja, A., Drenkhan, R., Gaitnieks, T., Hantula, J. 2011. First record of *Chalara fraxinea* in Finland and genetic variation among isolates sampled from Åland, mainland Finland, Estonia and Latvia. Forest Pathology 41, 169–174.
- Stener, L. G. 2013. Clonal differences in susceptibility to the dieback of *Fraxinus excelsior* in southern Sweden. Scan. J. of Forest Research 28(3), 205–216.
- Talgø, V., Sletten, A., Brurberg, M. B., Solheim, H., Stensvand, A. 2009. *Chalara fraxinea* isolated from diseased ash in Norway. Plant Disease 93(5), 548.
- Tallent-Halsell, N. G. 1994. Forest Health Monitoring. Field Methods Guide 1994. U.S. Washington, D.C. 1994. Environmental Protection Agency EPA/620/R-94/027, 267 s. [on-line]. Dostupné na WWW: <http://nepis.epa.gov/Exe>.

- Thomsen, I. M., Skovsgaard, J. P., Barklund, P. a Vasaitis, R. 2007. Svampessygdom er årsag til toptorre i ask. Skoven (Skov & Landskab; Kobenhavns Universitet, Kopenhagen, DK) 5, 234–236.
- Timmerman, V., Børja, I., Hietala, A. M., Kirisits, T., Solheim, H. 2011. Ash dieback: pathogen spread and diurnal patterns of ascospore dispersal, with special emphasis on Norway. OEPP/EPPO Bulletin 41, 14–20.
- Queloz, V., Grünig, C. R., Berndt, R., Kowalski, T., Sieber, T. N., Holdenrieder, O. 2011. Cryptic speciation in *Hymenoscyphus albidus*. Forest Pathology 41, 133–142.
- Schumacher, J., Kehr, R. a Leonhard, S. 2010. Mycological and histological investigations of *Fraxinus excelsior* nursery saplings naturally infected by *Chalara fraxinea*. Forest Pathology 40, 419–429.
- Schumacher, J. 2011. The general situation regarding ash dieback in Germany and investigations concerning the invasion and distribution strategies of *Chalara fraxinea* in woody tissue. EPPO Bull. 40, 7-10.
- Sinclair, W. A., Lyon, H. H. 2005, Diseases of trees and shrubs. Second edition. Ithaca, New York, Cornell University Press, 660 s. ISBN 978–0–8014–4371–8.
- Skovsgaard, J. P., Thomsen, I. M., Skovgaard, I. M. and Martinussen, T. 2010. Associations among symptoms of dieback in even-aged stands of ash (*Fraxinus excelsior* L.). For. Path. 40, 7–18.
- Slavík, B. [ed.] (1997). Květena České Republiky 5. Academia Praha, s. 447–450.
- Smitley, D. 2008. Four-year test shows that an annual basal drench with imidacloprid protects trees from emerald ash borer. Integrated Pest Management Resources. [on-line]. Dostupné na WWW: <<http://www.ipm.msu.edu/cat08land/105-16-08.htm>>.
- Szabó, I. 2009. First report of *Chalara fraxinea* affecting common ash in Hungary. Plant Pathology 58, 797.
- Úradníček, L., Maděra, P., Tichá, S., Koblížek, J. 2009. Dřeviny České republiky. Lesnická práce, Kostelec n. Č. l., druhé vydání, 368 s.
- Válek, Z. 1977. Lesní dřeviny jako vodohospodářský a protierozní činitel. SZN, Praha, 280s.
- Vyskot, M. 1978. Pěstění lesů. SZN, Praha, 448 s.
- Wardle, P. 1961. Biological flora of the British Isles. *Fraxinus excelsior* L. Journal of Ecology 49, 739–751.

- Weis, A. [2000] – Topographic position and Landforms Analysis. The Nature Conservancy. Jenness Enterprises, Flagstaff, USA [on-line]. Dostupné na WWW: <<http://www.jennessent.com/arcview/tpi.htm>>.
- Wulf, A. 1944. Fungal leaf diseases of maple with special consideration of the sycamore maple (*Acer pseudoplatanus* L.). Schriften aus der Forstliche Fakultät der Universität Göttingen und der Niedersächsischen Forstlichen Versuchsanstalt. J. Sauerländer's Verlag, Frankfurt, Germany.
- Zachara, T., Zajaczkowski, J., Łukaszewicz, J., Gil, W., Paluch, R. 2007. Possibilities for prevention of ash decline by silvicultural methods (in Polish). Leś. Pr. Badaw. 3, 149–150.
- Zhao, Y. J., Hosoya, T., Baral, H. O., Hosaka, K., Kakishima, M. 2012. *Hymenoscyphus pseudoalbidus*, the correct name for *Lambertella albida* reported from Japan. Mycotaxon 122, 25–41.